

**U. PORTO**



**FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO**

**Mestrado em Controlo de Qualidade**

**CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO DO QUEIJO  
TERRINCHO: ESTUDO DA PROTEÓLISE E AVALIAÇÃO DA  
AUTENTICIDADE POR HPLC/UV**

**CARLA BEATRIZ RODRIGUES VEIROS**

**PORTO, 2005**

**CARLA BEATRIZ RODRIGUES VEIROS**

Licenciada em Ciências Farmacêuticas

**CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO DO QUEIJO  
TERRINCHO: ESTUDO DA PROTEÓLISE E AVALIAÇÃO DA  
AUTENTICIDADE POR HPLC/UV**

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto  
para obtenção do grau de Mestre em Controlo da Qualidade  
na área da especialidade Água e Alimentos

FACULDADE DE FARMACIA
L. P.
BIBLIOTECA
Data 25/01/2006
Reg. 3312
Cota

FFM  
VEI

PORTO

2005

Trabalho realizado no Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da  
Universidade do Porto, sob orientação da

**Prof. Doutora Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira**

---

## Agradecimentos

À Prof. Doutora Isabel Ferreira, minha orientadora, agradeço todos os ensinamentos, apoio, incentivo e disponibilidade, ao longo deste período da minha vida. Graças ao seu entusiasmo e empenho permitiu que eu chegasse ao fim desta etapa.

Ao Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia do Porto, na pessoa da Prof. Doutora Beatriz Oliveira, por todas as condições disponibilizadas para a concretização deste trabalho.

Ao Projecto AGRO nº26 que financiou este trabalho.

Ao Prof. Doutor António Peres e ao Prof. Doutor Álvaro Mendonça por todo o apoio prestado ao longo deste trabalho, especialmente pela cedência das amostras.

À Doutora Olívia, Eng.<sup>a</sup> Elisa, Susana Casal, Sara, Joana, Dr.<sup>a</sup> Eulália, Lúcia e Isabel Mafra, quer pelos ensinamentos, quer pelo apoio constante e companheirismo que facilitaram o trabalho no laboratório.

Aos meus amigos, pela paciência de uma longa ausência.

Aos meus colegas de Mestrado, pela amizade e boas recordações que persistem.

Aos meus pais, Laila e Diamantino, à minha sogra, Gloria e aos meus irmãos, Landa e Jaime, por sempre acreditarem em mim e me ensinarem a seguir em frente.

Ao meu marido, Luis, pelo carinho, paciência e apoio incondicionais e, sobretudo, por todo o seu amor.

Ao meu bem mais precioso, a pequenina Beatriz, por ter vindo encher a minha vida de felicidade. O meu pedido desculpas por ter estado tantas vezes ausente.

A todos, em geral, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

---

## Resumo

O queijo *Terrincho* é um queijo com Denominação de Origem Protegida, preparado com leite cru inteiro de ovelhas da raça *Churra da Terra Quente*, utilizando coalho animal. Este queijo requer um período mínimo de maturação de 30 dias.

Neste trabalho avaliou-se a evolução do processo proteolítico durante a maturação do Queijo DOP *Terrincho*, com base no perfil de proteínas obtido pela análise de HPLC/UV da fracção insolúvel a pH 4,3. A fracção mais sensível à proteólise foi a  $\alpha_{S1}$ -caseína levando à formação de peptídeo  $\alpha_{S1}$ -I. A  $\kappa$ -caseína e a  $\alpha_{S2}$ -caseína também foram degradadas ao longo dos 30 dias de maturação. Pelo contrário a  $\beta$ -caseína foi mais resistente à hidrólise enzimática. Foi possível estabelecer uma regressão linear múltipla para prever o tempo de maturação do queijo *Terrincho*, utilizando 2 variáveis – áreas da  $\alpha_{S1}$ -caseína e do peptídeo  $\alpha_{S1}$ -I – e uma constante. O erro de estimacção foi de 2,5 dias.

Avaliou-se a influência da origem do leite na proteólise do queijo pela comparação dos perfis cromatográficos e electroforéticos, ao longo da maturação, do Queijo DOP *Terrincho* e de queijos manufacturados, seguindo a mesma tecnologia, mas utilizando leite cru de vaca e misturas de leite de vaca cru e de leite de ovelha. Adicionalmente, correlacionou-se a composição em caseína dos queijos, aos 30 dias de maturação, com as características organolépticas, utilizando para o efeito um painel sensorial treinado.

Os queijos produzidos com 100% de leite de vaca e com 10 e 20% de leite de vaca em leite de ovelha apresentaram perfis cromatográficos e electroforéticos distintos, devido a diferenças na  $\alpha_{S1}$ -caseína bovina e ovina. No entanto, a evolução da proteólise foi semelhante. Em queijos com 30 dias de maturação, apenas 20-25% da  $\alpha_{S1}$ -caseína permaneceu intacta. A fracção da  $\beta$ -caseína foi a mais resistente à hidrólise. A

---

degradação da  $\alpha_{S1}$ -caseína, ao longo da maturação, dificulta a detecção de leite de bovino.

A análise discriminante aplicada aos dados de RP-HPLC indicou que as diferenças nas fracções de caseína do queijo *Terrincho* e queijos de mistura se deviam, sobretudo, ao conteúdo em  $\beta$ -caseína. A função assim obtida permitiu classificar correctamente todas as amostras, de acordo com o tipo de queijo.

O perfil de análise descritiva sensorial do queijo *Terrincho* revelou que este apresentava maior fracturabilidade e adesividade e menor elasticidade e dureza. Estes parâmetros estavam correlacionados com o seu menor conteúdo em caseína total.

---

## Abstract

*Terrincho* cheese bears the status of Protected Denomination of Origin and is manufactured from raw ewe milk from *Churra da Terra Quente* race, using animal rennet. This cheese needs, at least, a period of 30 days of ripening before it can be sold.

This work had the main objective of evaluating the proteolytic process during ripening of DOP *Terrincho* cheese. A detailed evaluation of the effect of ripening time on the breakdown of the caseins fractions, along with the formation of major breakdown products of casein hydrolysis was monitored by RP-HPLC of the pH 4.3 insoluble fraction.  $\alpha_{s1}$ -casein was the most extensively hydrolysed fraction leading to the formation of  $\alpha_{s1}$ -I peptide.  $\kappa$ -casein and  $\alpha_{s2}$ -casein were also hydrolysed during the 30 days of ripening.  $\beta$ -casein fraction was more resistant to hydrolysis. The ripening time of *Terrincho* cheese can be predicted using 2 variables, normalized peak areas of  $\alpha_{s1}$ -casein and  $\alpha_{s1}$ -I peptide, and a constant. The estimation error was 2.5 days.

The influence of milk origin on cheese proteolysis was evaluated by comparison of chromatographic and electrophoretic profiles, during ripening of *Terrincho* cheese, bovine and mixture bovine/ovine cheeses. Additionally, casein content at 30 days of ripening was correlated with organoleptic characteristics, using a trained panel.

Cheeses manufactured with the same technology of *Terrincho* DOP, but using bovine milk and with 2 levels of bovine milk (10 and 20%) in ovine milk revealed different chromatographic and electrophoretic profiles, but similar proteolysis progress. However, in both methods at 30 days of ripening the visual detection of bovine milk was difficult owing to degradation of  $\alpha_{s1}$ -casein. Only 20-25 % of this fraction remained intact.  $\beta$ -casein was more resistant to hydrolysis.

The discriminate analysis applied to RP-HPLC data indicated that at 30 days of ripening, differences between casein fraction of *Terrincho* cheese and mixture cheeses

---

were mainly from  $\beta_1$ -casein content. The function thus obtained was able to correctly classify all the samples according to cheese type.

*Terrincho* cheese descriptive sensory profile distinguished from bovine and mixture cheeses owing to its higher fracturability and adhesiveness and lower elasticity and hardness, these parameters were correlated with its lower total casein content.

---

## Abreviaturas

Ala - Alanina

Arg - Arginina

Asn - Asparagina

Asp - Ácido Aspártico

aW - Actividade da água

bP - Pares de bases

CEC - Capillary Electrochromatographic (Electrocromatografia Capilar)

CMP - Caseinomacropéptido

CN - caseína

CV - Coeficiente de variação

Cys - Cisteína

Cytb - Citocromo b

d.i - Diâmetro interno

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DOP - Denominação de Origem Protegida

DSTD - Dynamic Surface Tension Detector (Detector de Tensão Superficial Dinâmica)

ELISA - Ensaio Imunoenzimático

FIA - Ensaio de Imunofluorescência

---

GC-MS – Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa

Gln – Glutamina

Glu – Ácido glutâmico

Gly – Glicina

His – Histidina

HPLC – High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Resolução)

IgG – Imunoglobulina

IRMS – Isotope Ratio Mass Spectrometry

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

Leu – Leucina

LPL – Lipoproteínas

Lys – Lisina

Met – Metionina

mtDNA – Ácido Desoxirribonucleico Mitocondrial

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reacção em Cadeia da Polimerase)

Phe – Fenilalanina

POV – Valor de peróxido

Pro – Prolina

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorfism (Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição)

RIA – Ensaio Radioimunológicos

---

RP-HPLC – Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Performance em Fase Reversa)

SDS-PAGE - Electroforese em gele de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio

Ser – Serina

-SH – Grupos sulfrídilo

SPME – Solid Phase Microextraction (Microextração em Fase Sólida)

-S-S – Ligação dissulfureto

TBA – Ácido Tiobarbitúrico

TFA – Ácido Trifluoracético

Thr – Treonina

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

Trp – Triptofano

Tyr – Tirosina

UHT – Ultra-High Temperature (Ultra pasteurizado)

Ureia-PAGE – Electroforese em gele de poliacrilamida na presença de ureia

UV – Ultra Violeta

Val – Valina,

VIS – Visível

---

**Publicações desenvolvidas no decurso da preparação desta dissertação:**

1. *“Avaliação da proteólise de queijos de ovelha, de vaca e de mistura: correlação com as características organolépticas”.*

C.B. Veiros, L.H.M.L. Santos, I.M.P.L.V.O. Ferreira.

Livro de resumos do 3º Encontro Nacional de Química Analítica, Analítica 03, Porto, 18 e 19 de Novembro de 2003.

2. *“Queijos com Denominação de Origem Protegida: como garantir a sua autenticidade”*

I.M.P.L.V.O. Ferreira, O. Pinho, C.B. Veiros, A. Roxo, I. Mafra

Livro de resumos das Jornadas de Controlo de Qualidade de Produtos Regionais, 6º Painel, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, 30 e 31 de Maio de 2005.

3. *“Casein breakdown in Terrincho ovine cheese: Comparison with bovine cheese and with bovine/ovine cheeses”*

I.M.P.L.V.O. Ferreira, C.B. Veiros, O. Pinho, A.C.A. Veloso, A.M. Peres

J. Dairy Sci. (submetido para publicação).

---

4. *“Characterization of “Transmontano” caprine cheese proteolysis”*

I.M.P.L.V.O. Ferreira, O. Pinho, L. Magalhães, E. Mendes, C. Veiros

Int. Dairy J. (submetido para publicação).

---

## Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	vi
Abreviaturas	viii
Publicações desenvolvidas no decurso da preparação desta dissertação	xi
<b>Introdução geral e enquadramento da Tese</b>	
Organização da Tese	5
Queijo <i>Terrincho</i>	7
<b>Capítulo 1 – Introdução</b>	
1.1 – Composição do leite de ovelha, comparação com leites de outras origens	13
1.1.1 – Proteínas	15
1.1.1.1 – Caseínas	15
1.1.1.2 – Proteínas do soro	18
1.1.2 – Lípidos	19
1.1.3 – Lactose	21
1.2 – Principais etapas da produção do queijo	22
1.3 – Maturação do queijo	24
1.3.1 – Proteólise	26
1.3.1.1. – Factores que afectam a proteólise no queijo	32
1.3.1.2 – Métodos analíticos para avaliar a proteólise nos queijos	36
1.3.2. – Lipólise	43

---

---

1.3.2.1 – Factores que afectam a lipólise e a oxidação de lípidos no queijo	45
1.3.2.2 – Métodos analíticos para avaliar a lipólise no queijo	47
1.4 – Avaliação sensorial da textura e do <i>flavour</i> do queijo	50
1.5 – Autenticidade do queijo	54
1.5.1 – Métodos cromatográficos	56
1.5.2 – Métodos electroforéticos	60
1.5.3 – Métodos imunológicos	62
1.5.4 – Métodos de análise de DNA	65
1.6 – Objectivos	69

## **Capítulo 2 – Materiais e métodos**

2.1 – Amostragem	72
2.2 – Determinação do teor de humidade e pH dos queijos	75
2.3 – Preparação da amostra	75
2.3.1 – Extracção das caseínas	75
2.3.2 – Dissolução da amostra	76
2.4 – HPLC/UV na análise das caseínas	77
2.4.1 – Padrão e reagentes	77
2.4.2 – Equipamento	78
2.4.3 – Condições cromatográficas	78
2.4.4 – Identificação das caseínas	79
2.4.5 – Quantificação das caseínas e avaliação dos limites de detecção	79
2.4.6 – Ensaios de recuperação	80
2.5 – Análise das caseínas por Ureia-PAGE	81
2.6 – Análise sensorial dos queijos	82
2.7 – Análise estatística	84

## **Capítulo 3 – Resultados e discussão**

3.1 – Precipitação das caseínas	86
3.2 – Cromatografia Líquida de Alta Performance em fase reversa para separação das caseínas	87
3.2.1 – Perfil cromatográfico das fracções da caseína	87

---

---

3.2.2 – Linearidade, curvas de calibração e limites de detecção	88
3.2.3 – Quantificação das caseínas e ensaios de recuperação	89
3.2.4 – Perfil cromatográfico das fracções de caseína do queijo <i>Terrincho</i> e estudo da evolução da proteólise	91
3.2.4.1 – Comparação entre os queijos A e B	94
3.2.4.2 – Exploração dos dados de HPLC	95
3.3 – Previsão do tempo de maturação do queijo <i>Terrincho</i> DOP em função da proteólise	99
3.4 – Avaliação da autenticidade do queijo <i>Terrincho</i> : comparação com a composição de queijo de vaca e queijos de mistura	101
3.4.1 – Humidade, pH e caseína total	101
3.4.2 – Comparação do perfil cromatográfico da fracção insolúvel a pH 4,3 dos queijos <i>Terrincho</i> , de vaca, de mistura 1 e 2	103
3.4.3 – Comparação do perfil electroforético da fracção insolúvel a pH 4,3 dos queijos <i>Terrincho</i> , de mistura 1 e 2 e de vaca	109
3.4.4 – Aplicação da análise discriminante para a distinção dos queijos <i>Terrincho</i> , de vaca e de mistura	110
3.5 – Influência da origem do leite nas características sensoriais dos queijos	112
<b>Conclusões globais</b>	117
<b>Bibliografia</b>	123
<b>Anexos</b>	145

---

*Introdução Geral e Enquadramento da Tese*

## ***INTRODUÇÃO GERAL E ENQUADRAMENTO DA TESE***

Durante milhares de anos, os leites de cabra e de ovelha constituíram a base da alimentação em muitas áreas do mundo. A ovelha foi, certamente, dos primeiros animais a serem domesticados pelo homem, no seu esforço para um modo de vida sedentário, dedicado à agricultura e à pecuária. Este descobriu depois, a possibilidade de conservação do leite, através da sua transformação em queijo, tendo-se, assim, desenvolvido diversas técnicas de fabrico deste produto.

Embora a vaca tenha substituído a ovelha para a obtenção de leite, devido ao seu elevado potencial de produção, o leite de ovelha continua a constituir um empreendimento forte e viável. Actualmente, os queijos de ovelha são amplamente procurados, devido ao seu sabor incomparável, à sua grande riqueza nutritiva e à sua associação ao conceito de produto tradicional.

No entanto, as variações sazonais na disponibilidade do leite de ovelha, associado ao preço mais elevado em relação ao leite de vaca, fazem com que aquele seja frequentemente misturado com este último, na preparação de queijos. Deste modo, é importante caracterizar a composição dos queijos tradicionais de cabra e de ovelha, assim como estabelecer métodos que permitam determinar a matéria-prima que entra na composição destes queijos, por forma a garantir a genuinidade dos queijos fabricados com leites puros, bem como as percentagens de leites, em queijos de mistura (IDF, 1984).

Não existe melhor forma de designar um produto, famoso graças ao seu território e aos segredos da sua elaboração, do que pelo próprio nome do local que o originou. Surgem, assim, as demarcações de origem. Mas, a celebridade de um nome suscita a inveja, a imitação, originando a falsificação. Depois do nome geográfico, do território, dos usos e segredos tradicionais, aparece o conceito de «qualidade». Este abrange, por um lado, a questão regulamentar, definida pelas proporções dos constituintes, associada a determinadas técnicas, e por outro, a questão dos aspectos organolépticos, apreciados pelos consumidores, pelos *gourmets* e, especialmente, pelos gastrónomos.

Os produtos artesanais, de uma maneira geral, e muito particularmente os lacticínios tradicionais, possuem um valor intrínseco extremamente elevado, devido não só à riqueza das suas propriedades organolépticas, mas também, ao facto de serem o resultado de centenas de anos de evolução de práticas ancestrais, através da experiência empírica de muitas gerações. Por outro lado, a produção de produtos artesanais, como é o caso do queijo, tem uma importância crescente para o desenvolvimento sócio-económico das populações rurais (Malcata e Macedo, 1994).

Manter no mercado um espaço reservado aos produtos tradicionais, dignos da confiança dos consumidores, ainda que mais caros, é lutar contra a tendência actual de centralização das sociedades e contra a falta de interesse pela genuinidade e autenticidade dos produtos da nossa província e das suas culturas locais.

Em geral, a maioria dos queijos artesanais comercializada na União Europeia é classificada de acordo com a região de produção e/ou o método de fabrico utilizado. Estas variações nos métodos de produção resultam numa ampla gama de tipos de queijos, dos quais alguns apresentam características organolépticas muito apreciadas, que se reflectem num aumento do seu valor comercial. Quando os produtores de queijo desejam proteger o seu produto, podem obter a Denominação de Origem Protegida (DOP) de acordo com a Regulamentação 2081/92 da Comissão Europeia. Compreende-se, assim, que haja um incentivo financeiro para o fabrico ou venda fraudulentos, de um queijo de qualidade inferior, sem DOP, como se se tratasse de um queijo com DOP.

Tal como aconteceu com diversos países europeus, Portugal adoptou o mecanismo de Denominação de Origem Protegida para defender as designações

originais dos seus queijos mais típicos. No nosso país, podem usar o nome específico da DOP os seguintes queijos: Queijo de Azeitão, Queijo de Cabra Transmontano, Queijo de Évora, Queijo de Nisa, Queijo de São Jorge, Queijo Rabaçal, Queijo Serpa, Queijo Serra da Estrela, Queijo Terrincho, Queijo da Beira Baixa, Queijo Mestiço de Tolosa e Queijo do Pico

A produção dos queijos tradicionais portugueses avalia-se em cerca de 15 000-20 000 toneladas por ano, mas calcula-se que apenas, 10 a 15% desta produção seja controlada pelos organismos de Controlo e Certificação de queijos de ovelha, cabra e mistura, com DOP (Canada, 1998).

De todos os queijos portugueses com DOP, aquele que ocupa um lugar de destaque no Nordeste Transmontano é o Queijo *Terrincho*. Este queijo foi caracterizado no que respeita à flora microbiana nativa, índices de maturação, determinados através do fraccionamento selectivo de compostos azotados, solúveis ou não em determinados solventes e estudo da fracção volátil e textura, ao longo da maturação, assim como, correlação com as características sensoriais (Pinho, 2003; Pinho *et al.*, 2003a; 2003b; 2004a; 2004b, 2004c ). Para uma caracterização mais completa deste produto faltava, ainda, um estudo mais detalhado da evolução da fracção proteica, ao longo da maturação. Esse trabalho foi realizado nesta dissertação, tendo sido estabelecidos os seguintes objectivos:

- Avaliar o processo proteolítico, durante os 30 dias de maturação do queijo *Terrincho*, com base no perfil cromatográfico das proteínas da fracção insolúvel a pH 4,3.
- Prever o tempo de maturação do queijo *Terrincho* através de Análise de Regressão Múltipla dos resultados de HPLC.
- Avaliar a influência da origem do leite na proteólise do queijo, pela comparação dos perfis cromatográficos e electroforéticos, ao longo da maturação, do Queijo DOP *Terrincho* e de queijos manufacturados, seguindo a mesma tecnologia, mas utilizando leite cru de vaca e misturas de leite de vaca cru e de leite de ovelha.

- Efectuar Análise Quimiométrica dos resultados de HPLC para avaliar as modificações do perfil de proteínas, da fracção insolúvel a pH 4,3, no queijo *Terrincho* adicionado de leite de vaca, por forma a garantir a sua autenticidade.
- Correlacionar a composição da fracção insolúvel a pH 4,3, aos 30 dias de maturação, com as características organolépticas dos queijos analisados.

A análise da fracção insolúvel a pH 4,3 por HPLC/UV foi efectuada melhorando o método desenvolvido, optimizado e validado no Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia por Veloso (2001), o qual tinha sido aplicado ao estudo de queijo tipo *Terrincho*, mas de reduzidas dimensões (peso  $69 \pm 9,7g$ ).

A fracção insolúvel a pH 4,3 também foi analisada por electroforese em gel de ureia poliacrilamida utilizando o método de Andrews (1983), com algumas modificações.

As características organolépticas foram avaliadas recorrendo à análise sensorial, com um painel de provadores treinado.

Utilizaram-se técnicas estatísticas por métodos univariados, bivariados e multivariados, apropriadas para a análise dos resultados.

### ***Organização da Tese:***

Esta dissertação encontra-se dividida em 4 partes:

1. Introdução teórica, visando a composição do leite, a produção e maturação do queijo, assim como a sua avaliação sensorial e autenticidade – Capítulo 1
2. Amostragem – Capítulo 2

3. Resultados obtidos no estudo da evolução da proteólise do queijo *Terrincho* e previsão do tempo de maturação. Assim como, na avaliação da influência da origem do leite na proteólise e nas características sensoriais do queijo, incluindo os respectivos tratamentos estatísticos –  
Capítulo 3
4. Conclusões globais, bibliografia e anexos.

## QUEIJO *TERRINCHO*

O queijo *Terrincho* possui o estatuto de Produto com Denominação de Origem Protegida desde 1994, o qual é reconhecido pelo Regulamento (CE) nº 1107/96 de 12/06.

O seu fabrico é abrangido por legislação nacional que define as suas características principais e a sua área de produção (Despacho 16/94).

Este queijo é preparado com leite cru, proveniente de ovelhas da raça *Churra da Terra Quente*, ou *Terrincha*. Esta raça, que constitui actualmente 98% do efectivo ovino da região, expandiu-se a partir do século XIX, sendo o resultado do cruzamento das raças Badana e Mondegueira. Encontra-se bem adaptada à região, possuindo lã abundante, e caracterizando-se ainda, pela longevidade, facilidade de parto e qualidades maternais. A sua alimentação é feita em regime de pascigo permanente, à base de pastagens naturais e de forragens, de folhagem de freixo, olmo, amendoeira, oliveira, vinha e também de algumas plantas arbustivas típicas da região, como a giesta negral, urze, carqueja e a esteva.

O Queijo *Terrincho* classifica-se como sendo um queijo curado, de pasta semi-dura. Apresenta-se sob a forma de cilindro baixo, tipo «prato», regular, com algum arredondamento lateral nas faces, sem bordos definidos. A crosta é maleável, bem formada, lisa, de coloração amarelo palha clara e uniforme. O diâmetro pode variar entre 13 a 20 cm e a altura entre 3 e 6 cm, com um peso que pode ir de 800 a 1200 g. O teor de gordura no extracto seco varia entre 45 a 65% e a humidade, referida no queijo isento de matéria gorda, varia entre 55 e 63%. Este queijo apresenta uma textura fechada e uniforme, com pasta ligeiramente untuosa, com alguns olhos, e por vezes deformável. Possui um sabor suave, limpo e muito característico (Salino, 1994; Barbosa 1998; Canada, 1998).

Este queijo é o produto da cura natural controlada, que resultou do esgotamento lento da coalhada, após a coagulação do leite de ovelha cru extreme, com coalho de origem animal. A sua maturação deve efectuar-se em locais de cura natural, ou em instalações de ambiente controlado durante 30 dias, com temperatura entre 5 a 12°C e humidade relativa entre 80 e 85%.

Tanto a preparação, como a maturação têm que se restringir a uma área geográfica perfeitamente definida (Figura 1), que engloba os concelhos de Mogadouro, Alfândega da Fé, Torre de Moncorvo, Freixo de Espada à Cinta, Mirandela, Vila Flor, Carrazeda de Ansiães, Macedo de Cavaleiros, no distrito de Bragança; Valpaços, no distrito de Vila Real, São João da Pesqueira, no distrito de Viseu; e Vila Nova de Foz Côa, Meda e Figueira de Castelo Rodrigo, no distrito da Guarda (Barbosa, 1998)

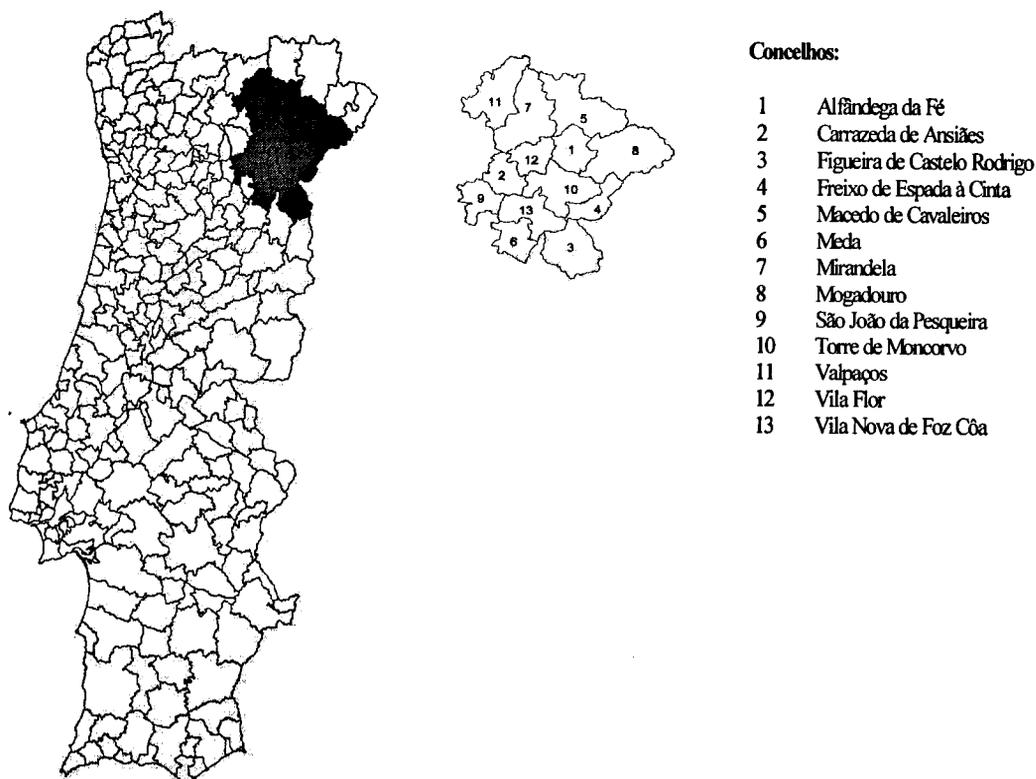


Figura 1 – Área de produção de Queijo *Terrincho*.

## *Capítulo 1*

## ***CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO***

### **1.1 – COMPOSIÇÃO DO LEITE DE OVELHA, COMPARAÇÃO COM LEITES DE OUTRAS ORIGENS**

O leite e os produtos lácteos constituem os principais componentes da dieta humana nos países ocidentais, fornecendo cerca de 30% das proteínas e dos lípidos e cerca de 80% do cálcio da dieta. Estima-se que, da produção anual de leite –  $\sim 600 \times 10^6$  toneladas – 85% são provenientes de vaca, 11% de búfalo, 2% de cabra e 2% de ovelha. Embora uma parte deste leite seja consumida na forma crua, a maior parte é processada em menor, ou maior extensão. O leite, enquanto bebida, representa aproximadamente 40% da produção total de leite. O remanescente é transformado pela indústria leiteira em milhares de produtos. Este é, provavelmente, o sector que maior diversidade e flexibilidade apresenta dentro da indústria alimentar. As potencialidades de processamento do leite residem nas propriedades químicas e físicas dos seus componentes (Fox, 2000).

O leite apresenta-se como uma emulsão O/A, uma suspensão e uma solução. Emulsão de matéria gorda e suspensão coloidal de natureza proteica e mineral, numa fase aquosa contendo açúcares e proteínas solúveis, minerais, vitaminas e outros compostos minoritários importantes para o desenvolvimento dos mamíferos. Além disso, estão presentes outros elementos como células epiteliais, leucócitos, etc.

Qualquer que seja a sua origem, o leite é composto pelos mesmos constituintes

maioritários, variando apenas a percentagem de cada um deles, tal como se pode observar na Tabela 1.

Tabela 1 – Comparação da composição do leite de ovelha com leite de outras origens.

	Ovelha	Vaca	Cabra	Humano
Mat. Seca (%)	17,4-18,9	10,5-14,3	11,9-14,0	11,5-13,9
Gordura (%)	6,0-7,5	2,8-4,8	4,1-4,5	3,7-4,6
Alb. Glob. (%)	0,9-1,1	0,3-0,8	0,4-1,0	0,8-1,7
Caseína (%)	4,3-4,6	2,5-3,6	2,5-3,3	0,4
Lactose (%)	4,3-4,8	4,2-5,0	4,1-4,4	6,4-7,0
Cinzas (%)	0,9	0,7-0,9	0,8	0,2
Cálcio (mg/l)	2030	1360	—	—
Sódio (mg/l)	360	460	—	—
Vit.A (mg/l)	0,5	0,3	—	—
Vit.E (mg/l)	15,8	7	—	—
Vit.C (mg/l)	40,0	22	—	—
Kcal/100g	113	73	77	73

(Adaptado de Alfa-Laval 1981)

O leite de ovelha contém quase o dobro da matéria sólida do que o leite de vaca, assim como, maior quantidade de caseínas e de gordura – são necessários apenas 4 ou 5 kg de leite de ovelha para produzir 1 kg de queijo, enquanto que, para produzir a mesma quantidade de queijo de vaca se requerem 10 kg de leite. Por outro lado, o seu elevado

conteúdo em caseína torna o tempo de coagulação mais curto, com a obtenção simultânea de uma coalhada mais firme (Jandal, 1996).

### 1.1.1. – PROTEÍNAS

As proteínas têm um papel nutricional, pois fornecem aminoácidos essenciais e um papel fisiológico, actuando como anticorpos e neuromediadores e transportando vitaminas e minerais. As proteínas do leite podem ser divididas em três grupos: (i) as proteínas das membranas dos glóbulos de gordura, que contribuem numa percentagem muito pequena para o conteúdo total de proteínas; (ii) as caseínas que estão no estado coloidal, na fracção micelar e (iii) as proteínas solúveis, designadas por proteínas do soro.

Deste modo, as proteínas constituem a fracção mais importante no leite, tanto em termos qualitativos, como quantitativos.

As proteínas da fracção micelar compreendem 4 tipos diferentes de caseínas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\kappa$  caseína. Estas agrupam-se formando submicelas, que por sua vez se agrupam com fosfato de cálcio, levando à formação de micelas (Figura 2).

#### 1.1.1.1 – CASEÍNAS

As caseínas caracterizam-se por uma escassa solubilidade a pH 4,6. A este pH precipitam, com excepção de alguns derivados proteolíticos. Uma vez que a sua solubilidade nestas condições é muito menor que a de qualquer proteína do soro, é possível obter uma clara separação entre estas e outras (Amigo, 1989).

As caseínas são únicas pelas suas propriedades físicas, não se assemelhando nem às proteínas globulares típicas nem às proteínas fibrosas. O modelo de submicelas é extensamente mas não universalmente aceite e propõe que as micelas são compostas por

submicelas que se mantêm ligadas como resultado das suas interações superficiais. À superfície ficam sobretudo as submicelas mais ricas em  $\kappa$ -caseína, que tem um papel estabilizador, uma vez que contém glicomacropéptido carregado negativamente. As submicelas encontram-se ligadas por  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ . Estas ligações estabelecem-se entre os grupos fosfato das  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\beta$ . As submicelas assemelham-se a esferas dando também à micela uma forma esférica imperfeita (Figura 2).

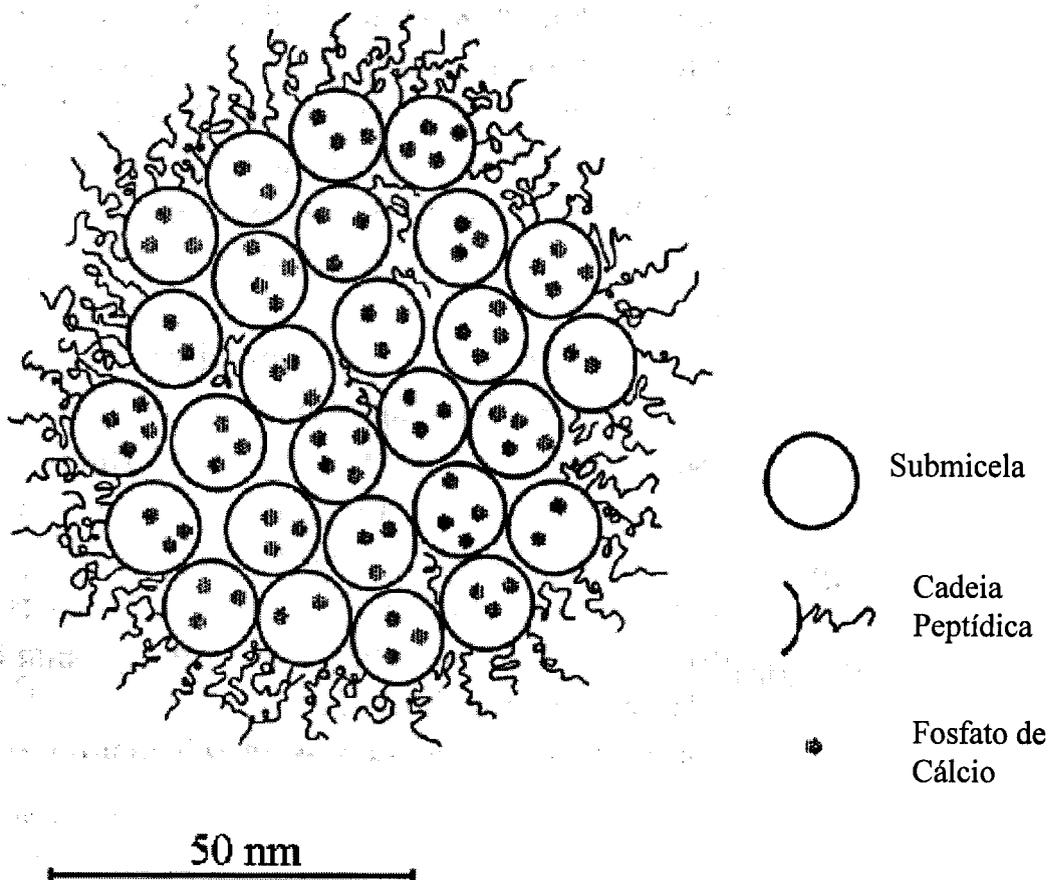


Figura 2 – Modelo esquemático da secção de uma micela de caseína (Walstra, 1999).

A percentagem de cada uma das fracções de caseína varia de espécie para espécie. A percentagem de  $\alpha_1$  e de  $\alpha_2$  é mais elevada no leite de ovelha do que no leite de cabra, mas  $\alpha_2$  é significativamente inferior no leite de vaca. A  $\beta$ -caseína, contudo, representa 50% da caseína total do leite de ovelha, 2/3 no leite de cabra e 1/3 no leite de

vaca (Tabela 2). Estas variações na percentagem de caseína explicam a diferença na estrutura micelar e a ausência de sabor amargo nos queijos de leite de ovelha (Berger, 2003).

No leite de ovelha, as caseínas constituem 80% das proteínas totais. Uma vez que o leite de ovelha contém um maior teor de caseínas, em relação ao leite de vaca, apresenta melhores propriedades de coagulação e, conseqüentemente, melhor potencial para a obtenção de queijo, comparativamente com o leite de vaca (Berger, 2003).

Tabela 2 – Composição em caseínas nos leites ovelha, vaca e cabra

Fracções das Caseínas	Percentagem na quantidade total de caseína		
	Ovelha	Vaca	Cabra
$\alpha_{S1}$	15,5	36	12,6
$\alpha_{S2}$	14,7	9,5	—
$\beta_1$	18,9	33	35,9
$\beta_2$	28,2	—	39,4
$\kappa$	7,3	9,4	8,1
$\gamma$	15,4	6,8	3,9

(Adaptado de Assenat, 1985)

De uma maneira geral, as caseínas caracterizam-se por possuírem uma ligação éster-fosfato. Todas as cadeias polipeptídicas das caseínas têm, pelo menos um destes grupos por molécula, ao contrário das proteínas do soro. Os grupos fosfato são

esterificados na forma de monoésteres de serina. Os fosfatos ligam-se fortemente aos cátions polivalentes, provocando a neutralização da carga e a precipitação das  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\beta$  caseínas. Quanto à  $\kappa$ -caseína, esta estabelece uma ligação fraca com os cátions, mas não é precipitada por eles. No leite, o cálcio é o principal cátion ligado. Nenhum dos 4 tipos de caseína possui uma estrutura secundária muito organizada, uma vez que todas elas e, especialmente a  $\beta$ -caseína, contêm níveis relativamente altos de prolina, o que evita a formação deste tipo de estruturas. Também se caracterizam por apresentarem baixo nível de estrutura terciária. Estes factos contribuem para a maior susceptibilidade da caseína à proteólise, o que é de grande importância na maturação do queijo.

#### 1.1.1.2 - PROTEÍNAS DO SORO

Permanecem em solução a pH 4,6 e incluem a  $\alpha$ -lactalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, albumina do soro sanguíneo, imunoglobulinas e péptidos de baixo peso molecular procedentes da proteólise de algumas caseínas. O soro lácteo contém ainda certo número das chamadas proteínas menores e algumas enzimas (Amigo, 1989).

As proteínas do soro apresentam elevados níveis de estrutura secundária, terciária e quaternária (Figura 3). Estas proteínas não são fosforiladas, sendo tipicamente proteínas globulares que se desnaturam por aquecimento. Estas proteínas são hidrossolúveis e não precipitam na presença de enzimas coagulantes ou de ácido.

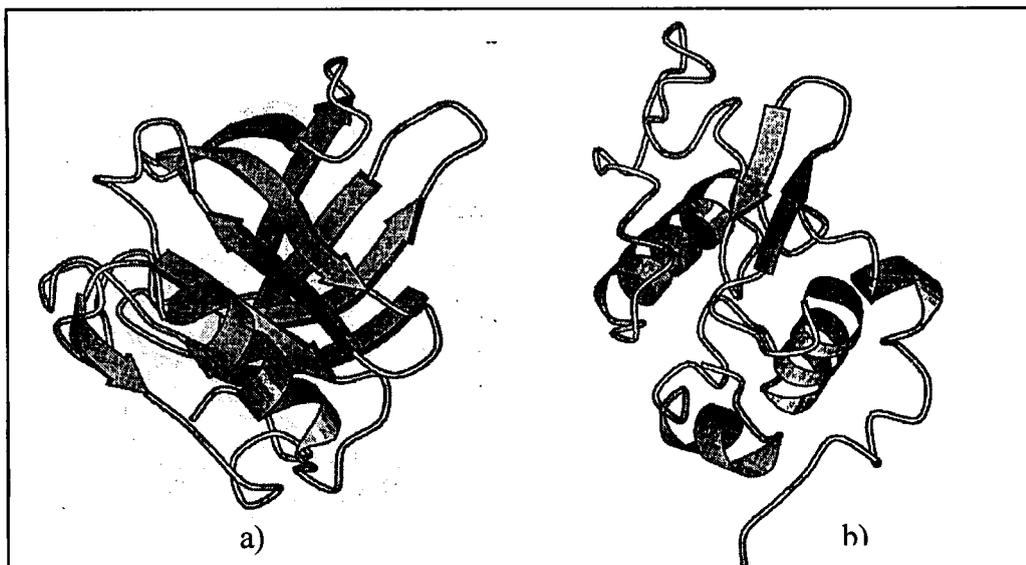


Figura 3 – a) Estrutura da  $\beta$ -lactoglobulina; b) Estrutura da  $\alpha$ -lactalbumina.

O leite de ovelha contém maior percentagem de  $\beta$ -lactoglobulina e menor de albumina sérica e imunoglobulinas, em relação à quantidade total de proteínas do soro, comparativamente com o leite de vaca. Existe muito mais  $\beta$ -lactoglobulina no soro de ovelha do que no soro de vaca, mas significativamente menos do que no soro de cabra. A composição do soro em termos de proteínas varia durante a lactação. A proporção de  $\alpha$ -lactalbumina diminui através da lactação enquanto a albumina sérica aumenta. Do mesmo modo, a  $\beta$ -lactoglobulina aumenta significativamente durante meados da lactação e depois decresce para valores semelhantes àqueles do início da lactação (Casper *et al.*, 1998).

### 1.1.2. – LÍPIDOS

O leite também contém gordura. Esta, além de fornecer energia, ácidos gordos essenciais, interfere na absorção de outros nutrientes, como por exemplo o cálcio e as vitaminas lipossolúveis e no desenvolvimento do cérebro e do sistema nervoso central. No leite a gordura distribui-se em glóbulos de gordura revestidos por uma membrana de natureza proteica. A parte central dos glóbulos de gordura tem cerca de 97,5% de triglicerídeos e 0,36% diglicerídeos, vitaminas e carotenóides.

A natureza da membrana é complexa, certos destes elementos são de origem citoplasmática, mas o essencial é constituído por material membranar das células epiteliais que englobam os glóbulos na hora da excreção: proteínas (42%), fosfolípidos (28%), glicerídeos (14%), glicolípidos (cerebrosídeos e gangliosídeos).

Os glóbulos de gordura do leite de ovelha apresentam um diâmetro médio de cerca de 3,3 microns, sendo inferiores aos glóbulos do leite de vaca (Assenat, 1985; Jandal, 1996). A cor da gordura no leite de ovelha é muito branca, devido à total ausência de  $\beta$ -caroteno (Assenat, 1985). Dos ácidos gordos dos leites de cabra e ovelha, 20% são ácidos gordos saturados de cadeia curta (C4:0 a C12:0), comparados com 12% no leite de vaca (Tabela 3). Uma vez que, as lipases atacam as ligações éster das cadeias curtas com mais rapidez, estas diferenças podem contribuir para uma digestão mais

rápida dos leites de ovelha e de cabra. A proporção mais elevada de ácidos de cadeia curta, tais como o caprónico, caprílico e cáprico no leite de ovelha, do que no leite de vaca (mas, menor que no leite de cabra) confere ao leite de ovelha o seu sabor e aroma especiais, ao mesmo tempo que outros componentes, tais como fosfolípidos e fenóis desempenham um importante papel (Kim Ha e Lindsay, 1991).

Tabela 3 – Comparação na composição em ácidos gordos nos leites de cabra, vaca e ovelha.

ÁcidoGordo	Ovelha	Vaca	Cabra
C4:0 (Butírico)	4,0	3,3	2,6
C6:0 (Caprónico)	2,6	1,6	2,9
C8:0 (Caprílico)	2,5	1,3	2,7
C10:0 (Cáprico)	7,5	3,0	8,4
C12:0 (Láurico)	3,7	3,1	3,3
C14:0 (Mirístico)	11,9	9,5	10,3
C16:0 (Palmitico)	25,2	26,5	24,6
C16:0 (Palmitoleico)	2,2	2,3	2,2
C18:0 (Estearico)	12,6	14,6	12,5
C18:1 (Oleico)	20,0	29,8	28,5
C18:2 (Linoleico)	2,1	2,5	2,2

(Adaptado de Jandal, 1996)

### 1.1.3 – LACTOSE

A lactose é principal hidrato de carbono presente no leite. Este possui ainda pequenas quantidades de outros açúcares, incluindo a glucose, frutose, glucosamina, galactosamina, ácido neuramínico e oligossacarídeos ácidos e neutros. A concentração de lactose no leite varia de acordo com a origem deste (Fox *et al.*, 2000c).

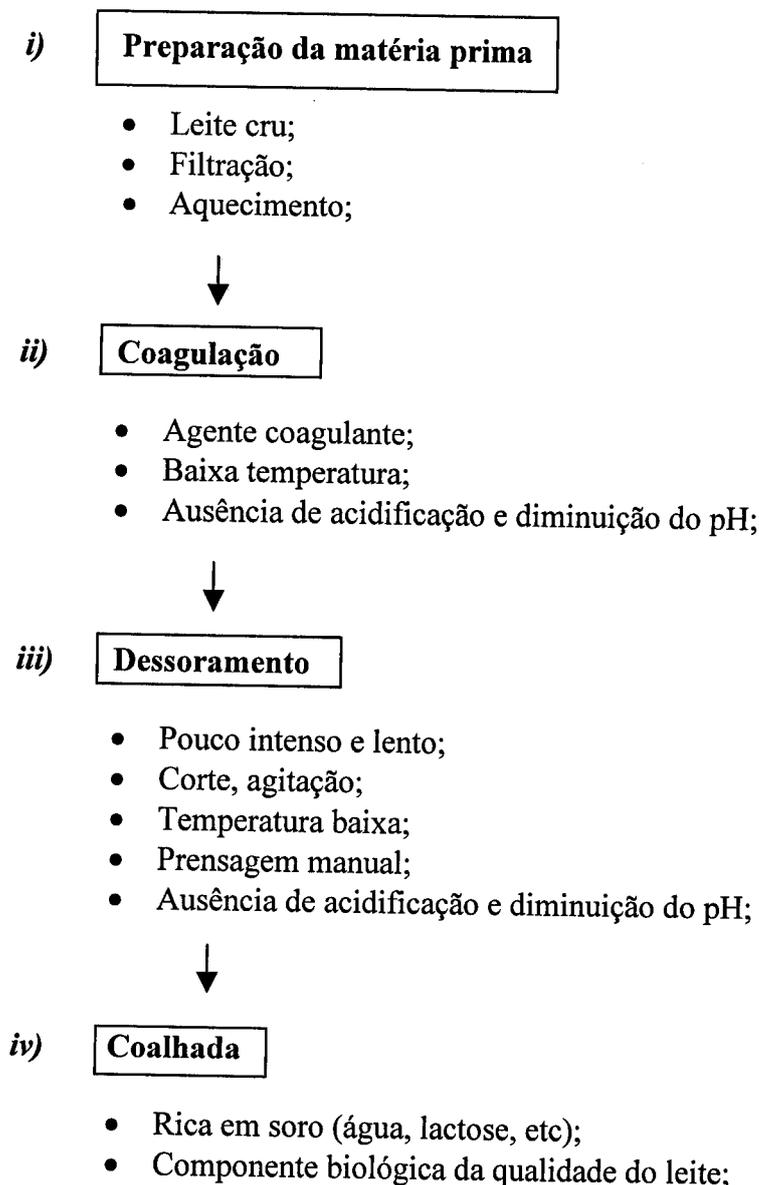
A lactose é responsável por cerca de 50% da pressão osmótica do leite. A sua concentração neste é independente da alimentação do animal, mas diminui à medida que a época de lactação avança e, sobretudo na presença de mastites (Fox, 2000).

A lactose é um oligossacarídeo que se encontra na forma reduzida, sendo composto por glucose e galactose, unidos por uma ligação 1-4-O-glicosídica. Uma vez que é um açúcar reduzido, pode sofrer reacções de *Maillard*, com consequências desagradáveis nos produtos lácteos, como por exemplo, alterações na cor, no *flavour*, e no valor nutritivo (Fox, 2000)

A fermentação da lactose pelas bactérias ácido-lácteas constitui um passo crítico na manufactura de todos os produtos lácteos fermentados. No fabrico de queijo, a maior parte da lactose é removida com o soro (Fox, 2000). A transformação da lactose remanescente no coalho, em ácido láctico, desempenha um importante papel na qualidade do queijo maturado (Fox *et al.*, 2000a). Uma quantidade excessiva de ácido láctico presente na coalhada conduz a uma diminuição do pH, a uma forte acidez, a um sabor acre e a uma textura quebradiça. Um excesso de lactose residual também pode ser fermentada por *lactobacillus* heterofermentativos, com produção de dióxido de carbono, originando uma textura com muitos orifícios (Fox, 2000).

## 1.2 – PRINCIPAIS ETAPAS DA PRODUÇÃO DE QUEIJO

Embora existam no mundo numerosas variedades de queijo, a produção da maioria deles engloba vários pontos em comum. Assim, variações num ou mais passos durante a sua manufactura, levam à obtenção de produtos com diferentes texturas e *flavours* (Gunasekaran e Mehmet Ak, 2003). Contudo, os passos essenciais do fabrico de queijo podem resumir-se no esquema representado na Figura 4.



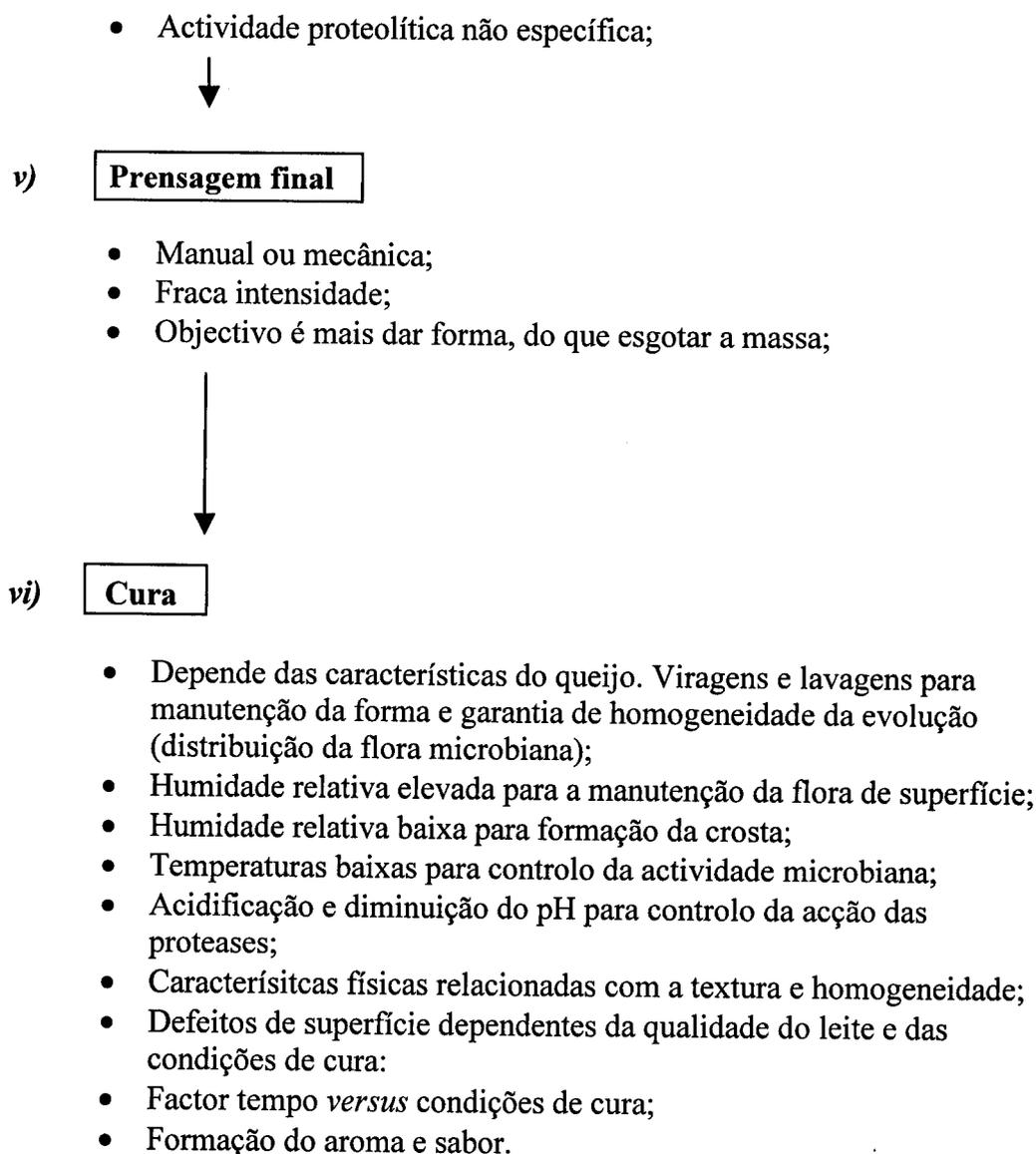


Figura 4 – Esquema da tecnologia de fabrico genérica do queijo tradicional (adaptado de Martins *et al.*, 2000)

### 1.3 – MATURAÇÃO DO QUEIJO

O queijo não é uma matéria sem vida, mas sim um sistema que se apresenta em constante mutação. Essas alterações são provocadas por alterações microbianas, enzimáticas e químicas. De facto, para se obter um produto final, que apresente as características desejadas, é necessário mudanças profundas na composição, ao longo de determinado espaço de tempo, designado por período de maturação.

Durante a maturação do queijo, observa-se uma série de acontecimentos bioquímicos, designadamente, a proteólise e a degradação de gordura e de hidratos de carbono, que são cruciais para o desenvolvimento textura e do sabor deste (Fox, 1989; Sousa e Malcata, 1997).

Neste período, muitos dos produtos de reacções primárias e os seus metabolitos funcionam como substrato para outras reacções, num processo em cadeia que evolui, de forma contínua. Embora este processo não esteja ainda estudado, em toda a sua amplitude, sabe-se que a maturação constitui uma fase importantíssima da produção do queijo, uma vez, que é neste período que se definem os caracteres organoléticos, tais como a textura e o *flavour*, que determinam certa variedade de queijo.

O estudo da maturação do queijo engloba diversas vertentes, como seja a avaliação de parâmetros químicos, bioquímicos, microbiológicos e reológicos, como a textura.

A textura de um alimento relaciona-se com as suas propriedades físicas, sendo estas consequência da sua composição química, e é importante na aceitação do queijo.

A percepção desta característica é feita visualmente, antes de se consumir o alimento, pelo tacto, ao segurá-lo e através de diversos receptores localizados na cavidade bucal quando se procede à mastigação, e ainda, pela audição. No caso do queijo, esta última relaciona-se com determinadas propriedades reveladas pelos sons que este emite quando manuseado de determinada forma e que o produtor se habituou a

reconhecer. Por outro lado, os receptores visuais permitem o reconhecimento imediato do aspecto e da cor do queijo (O'Riordan e Delahunty, 2003).

A textura de um queijo pode ser muito variada, podendo este ser classificado em duro ou macio, elástico ou quebradiço, etc. Esta característica pode ser avaliada através da análise sensorial – realizada através de um painel de provadores, na qual estes descrevem as sensações por eles percebidas, ao tocar, apertar, trincar e mastigar o queijo.

A textura é determinada, primariamente, pelo pH do queijo e pela razão entre a caseína intacta e o nível de humidade. Isto pode ser explicado pelo facto dos produtos resultantes da hidrólise da caseína serem altamente solúveis em água e não poderem contribuir para a matriz proteica (Waltra e Vliet, 1982). Por outro lado, a proteólise é também importante, no sentido em que por cada ligação proteica que se rompe, são gerados dois novos grupos iónicos e, cada um deles, vai competir pela água disponível no sistema. Assim, a água inicialmente disponível para solvatação das cadeias proteicas, ficará retida com os novos grupos iónicos.

Como se referiu, a qualidade de um queijo é determinada, em larga medida, pela sua textura. Contudo, há outros parâmetros que também determinam a aceitação e o valor de um queijo. É o caso da sua aparência, no que diz respeito, por exemplo, à cor, ao aspecto uniforme, à presença de olhos ou de bolores, e do seu *flavour*, o qual corresponde ao sabor e aroma que caracterizam um queijo.

O *flavour* de um queijo é influenciado pela proteólise e pela lipólise. A primeira, através da degradação de caseína em péptidos e aminoácidos e das respectivas reacções secundárias, que se relacionam com o metabolismo dos aminoácidos (revisão efectuada por McSweeney e Sousa 2000). Alguns desses aminoácidos estão mesmo associados ao sabor, como é o caso da arginina que se relaciona com o sabor amargo e da prolina e da serina que se relacionam com o sabor doce (Izco e Torre, 2000). Algumas substâncias do *flavour* apresentam ainda estruturas que parecem estar relacionadas com aminoácidos aromáticos de cadeia ramificada, sugerindo que são originadas, a partir destes compostos (Thierry e Maillard, 2002).

O *flavour* é também influenciado pela lipólise, através de reacções de catabolismo, associadas à libertação de ácidos gordos livres. Existem, contudo, ácidos

gordos, tais como, o propanóico, o acético e o fórmico, que resultam da acção da microflora do queijo sobre substratos, como a lactose, lactato, citrato e aminoácidos. Os ácidos gordos de cadeia média ou curta contribuem para o aroma, embora também, contribuam para o sabor ácido do queijo (Collins *et al.*, 2003). A esterificação de ácidos gordos livres com metanol e etanol, resulta na formação de metil e etil ésteres, o que contribui para o aroma frutado no queijo (Lecanu *et al.*, 2002).

Para além da lipólise e da proteólise, o *flavour* de um queijo é também determinado pela degradação de lactose e citrato, libertando-se diacetil, acetoína ou butan-2,3-diol, que podem ser transformados em butan-2-one e depois em butan-2-ol.

Assim, o aroma resulta do equilíbrio entre uma mistura complexa de compostos voláteis, como ácidos, cetonas, metilcetonas, álcoois e compostos sulfurosos, presentes no queijo. Esse equilíbrio vai sofrendo alterações ao longo do tempo, levando, conseqüentemente, a que o odor também se modifique (Lecanu *et al.*, 2002; Pinho *et al.*, 2001b, 2002; 2003a, 2003b).

Uma vez que, a qualidade de um queijo é fortemente influenciada pelo nível de peptídeos, aminoácidos e ácidos gordos livres, resultantes da proteólise e da lipólise (Igoshi *et al.*, 1986) será dada especial atenção à bioquímica da maturação, nomeadamente a estes dois processos.

### 1.3.1. – PROTEÓLISE

A proteólise é, provavelmente, o acontecimento bioquímico mais importante, que ocorre ao longo da maturação de um queijo, contribuindo em larga medida, para o seu sabor e a textura (Fox, 1989; Bustamante *et al.*, 2003; Hynes *et al.*, 2003).

A composição proteica inicial do leite irá condicionar as características da proteólise, durante a maturação do queijo. A firmeza da coalhada está fortemente relacionada com o conteúdo do leite em  $\alpha_{S1}$ -caseína (Jenness, 1980).

A  $\beta$ -caseína é mais resistente à degradação enzimática do que a  $\alpha_{S1}$ -caseína. A taxa de degradação das proteínas está fortemente associada com a acessibilidade das enzimas proteolíticas aos substratos do queijo, o qual depende da estrutura e configuração da matriz proteica do queijo. A proteólise no queijo pode ser dividida em 3 fases (Fox, 1989):

**Proteólise antes da produção do queijo** – esta é atribuída a dois tipos de enzimas, sobretudo proteinases indígenas do leite, ou de origem microbiana. Como exemplo de microorganismos encontrados no leite, podem citar-se bactérias psicotróficas, que a partir de determinada concentração ( $10^6$  cfu/ml), parecem provocar no queijo uma textura pastosa e o aparecimento de *off-flavours* (Hicks *et al.*, 1986).

São diversos os factores que afectam a concentração destas enzimas no leite, tais como a raça do animal, aspectos nutricionais e fase de lactação e situações de doença, como por exemplo, a existência de mastites.

As proteinases que não são provenientes da contaminação microbiana são transferidas do sangue para o leite.

Existem muitas proteases indígenas do leite que incluem a plasmina, plasminogéneo, activadores do plasminogéneo, trombina, catepsina D, proteinases ácidas do leite e aminopeptidases. O leite contém ainda diversas proteinases que são derivadas de leucócitos (células somáticas). Algumas proteinases são segregadas na forma inactiva. Nas condições fisiológicas, estes precursores são convertidos na forma activa por autólise (auto-activação) ou através de uma proteólise controlada, feita por outra proteinase (Aslam e Hurley, 2003).

A principal proteinase é a plasmina, também conhecida como proteinase alcalina do leite. A plasmina é um componente do sangue que tem como função fisiológica, solubilizar os coágulos de fibrina. Faz parte de um sistema complexo, o qual é constituído pela enzima activa, pelos seus precursores (plasminogéneos) e pelos seus activadores e inibidores. Todos estes componentes existem no leite. A plasmina, o plasminogéneo e os activadores do plasminogéneo estão associados com as micelas da

caseína no leite e, conseqüentemente, ficam incorporados na coalhada, enquanto que os seus inibidores ficam no soro, pelo que são eliminados.

As concentrações de plasmina, plasminogéneo e activadores do plasminogéneo são baixas durante o início da época de lactação. Contudo, as concentrações destas enzimas no leite, aumentam com o avançar do período de lactação, atingindo o seu valor máximo quando o animal deixa de produzir leite. O aumento da concentração neste período é atribuído ao aumento da permeabilidade da barreira sangue/leite, quando estas enzimas passam do sangue para o leite. A actividade da plasmina também se vê aumentada na presença de mastites, quando o número aumentado de células somáticas contribui para o aumento de activadores de plasminógeno que, por sua vez, activam a passagem de plasminogéneo a plasmina (Aslam e Hurley, 2003).

A principal actividade da plasmina no leite é a proteólise das suas proteínas, nomeadamente da caseína. Dentro das várias classes da caseína, a  $\beta$ -caseína é mais sensível do que a  $\alpha$ -caseína, sendo a  $\kappa$ -caseína um tanto resistente à sua acção. Os fragmentos resultantes da ruptura das caseínas podem originar *off-flavour* e sabor amargo no leite. Pelo contrário, as proteínas do soro, tais como a  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina são bastante resistentes à acção desta enzima (Aslam e Hurley, 2003).

Em todas as variedades de queijos estudadas, encontraram-se  $\gamma$ -caseínas, formadas a partir das  $\beta$ -caseínas. Aquelas podem funcionar, assim, como indicadores da actividade da plasmina, que pode ser confirmada no queijo, através da adição de um suplemento de plasmina ou de um inibidor (Fox *et al.* 2000b).

A plasmina apresenta um pH ideal de 7,5 (Bastian e Braun, 1996) e actua especificamente no C-terminal dos resíduos de arginina ou de lisina, particularmente na  $\beta$ -caseína e na  $\alpha_{s2}$ -caseína. A alta susceptibilidade da  $\alpha_{s2}$ -caseína tem sido relacionada com o seu conteúdo relativamente elevado em resíduos de lisina (Visser, 1981).

Esta enzima actua, como já foi referido, preferencialmente, sobre a  $\beta$ -caseína, hidrolisando-a em 3 pontos primários -  $\text{Lys}_{28}\text{-Lys}_{29}$ ,  $\text{Lys}_{105}\text{-His}_{106}$  e  $\text{Lys}_{107}\text{-Glu}_{108}$  - obtendo-se  $\gamma$ -caseína e proteose-peptonas (Fox, 1989).

A plasmina corta também a  $\alpha_{s2}$ -caseína em solução em 8 pontos:  $\text{Lys}_{21}\text{-Gln}_{22}$ ,  $\text{Lys}_{24}\text{-Asn}_{25}$ ,  $\text{Arg}_{114}\text{-Asn}_{115}$ ,  $\text{Lys}_{149}\text{-Lys}_{150}$ ,  $\text{Lys}_{150}\text{-Tyr}_{151}$ ,  $\text{Lys}_{181}\text{-Thr}_{182}$ ,  $\text{Lys}_{188}\text{-Ala}_{189}$  e

Lys<sub>197</sub>-Thr<sub>198</sub>, produzindo aproximadamente 14 peptídeos, três dos quais, potencialmente, amargos. Embora de forma menos activa, do que na  $\beta$ -caseína, ou mesmo na  $\alpha_{S2}$ -caseína, a plasmina hidrolisa ainda a  $\alpha_{S1}$ -caseína em solução nas seguintes ligações: Arg<sub>22</sub>-Phe<sub>23</sub>, Arg<sub>90</sub>-Tyr<sub>91</sub>, Lys<sub>102</sub>-Lys<sub>103</sub>, Lys<sub>103</sub>-Tyr<sub>104</sub>, Lys<sub>105</sub>-Val<sub>106</sub>, Lys<sub>124</sub>-Glu<sub>125</sub> e Arg<sub>151</sub>-Gln<sub>152</sub> (Mc Sweeney *et al.* 1993) A  $\alpha_{S1}$ -caseína pode ser hidrolisada lentamente em  $\lambda$ -caseína, também por acção da plasmina (Aimutis, 1982).

O plasminogéneo hidrolisa, rapidamente, a  $\alpha_{S2}$ -caseína, mas tem pouco efeito na  $\kappa$ -caseína, o que é benéfico para a estabilidade do leite. Embora a  $\kappa$ -caseína contenha vários pontos potenciais de clivagem é também muito resistente à plasmina, não tendo sido identificados produtos de cisão. Uma vez que são bastante estáveis ao calor, a plasmina e o plasminógeno, sobrevivem à pasteurização e à cozedura. Por este motivo, compreende-se que a plasmina seja a principal responsável pela proteólise primária nos queijos sujeitos a temperaturas elevadas, tais como o *Parmesão* e *Emmental* (Fox *et al.*, 2000a).

**Proteólise durante a produção do queijo** – as proteínas do leite sofrem coagulação enzimática durante a manufactura do queijo. Os queijos portugueses com Denominação de Origem Protegida são, geralmente, coagulados pela renina, produto de origem animal. A renina é uma mistura de quimosina, pepsina e outras enzimas, segregada pelas glândulas gástricas dos mamíferos jovens não desmamados, sobretudo vitelos, cordeiros e cabritos, que coagula as proteínas do leite.

Existem ainda algumas variedades de queijos portugueses e espanhóis, produzidos a partir de leite cru de ovelha, ou de cabra, que utilizam como coagulante extractos aquosos de flores de cardo de espécies do género *Cynara* L.A. Dentro destas, a mais utilizada é a espécie *C. Carduncullus* L.. Nesta, puderam isolar-se e caracterizar-se, 3 proteínases, de acordo com a sua actividade (Heimgartner, 1990).

No fabrico do queijo, a quantidade de coalho a adicionar, deve ser suficiente para coagular o leite entre 30-40 minutos. Essa quantidade situa-se, geralmente entre 200-220 ml de coalho padrão de cordeiro por 1 litro de leite (Fox *et al.*, 2000b). Uma vez que a quantidade de coalho que fica retida na coalhada é proporcional à quantidade

adicionada ao leite, este aspecto tem um efeito importante na velocidade da proteólise, ao longo da maturação.

A coagulação é um processo que ocorre em 2 fases (Fox, 1989): a primeira inclui a acção enzimática da quimosina sobre a  $\kappa$ -caseína, nas micelas da caseína, dando origem a dois péptidos: a para- $\kappa$ -caseína e o glicomacropéptido. A segunda envolve a precipitação da para- $\kappa$ -caseína pelo ião cálcio, a uma temperatura superior a 20°C, com a consequente formação de um gele, por associação das micelas modificadas na fase anterior. A para- $\kappa$ -caseína livre é rapidamente hidrolizada por muitas enzimas, contribuindo para um queijo bem madurado (Kosikowski, 1977).

Assim, o principal papel do agente coagulante, no fabrico de queijo, é a hidrólise específica da  $\kappa$ -caseína. Uma vez que neste processo se destrói a estabilidade coloidal da micela da caseína, ocorre a coagulação, desde que se verifiquem as condições apropriadas de temperatura e de concentração de cálcio.

Desta forma, o agente coagulante desempenha um papel muito importante na proteólise. No entanto, nem todas as proteínas – e dentro destas, as diferentes fracções de caseína – apresentam a mesma susceptibilidade a determinado coagulante.

Dois factores estão envolvidos na acção de um agente coagulante: por um lado a especificidade da enzima, por outro, a acessibilidade da ligação peptídica à enzima.

A quimosina ataca predominantemente a ligação Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> na  $\kappa$ -caseína. A clivagem da  $\kappa$ -caseína neste ponto origina dois fragmentos: a para- $\kappa$ -caseína e o glicomacropéptido. A maior parte do glicomacropéptido é eliminado no soro, contudo, a para- $\kappa$ -caseína permanece nas micelas da caseína, ficando, por isso, incorporada no queijo.

A  $\beta$ -caseína sofre muito pouca proteólise pela quimosina do queijo, especialmente devido ao conteúdo em NaCl, que afecta a conformação da proteína. A agregação da  $\beta$ -caseína, induzida pelo sal, com a consequente inacessibilidade das ligações sensíveis à quimosina, aumenta quando a razão sal / humidade aumenta (Lawrence, *et al.* 1987). Na  $\beta$ -caseína, a quimosina corta a ligação Leu<sub>192</sub>-Tyr<sub>193</sub>. O péptido maior  $\beta$ -CN f1-192 que resulta da cisão, designa-se por  $\beta$ -I-caseína.

A ligação Ala<sub>189</sub>-Phe<sub>190</sub> e as ligações que estão na região dos resíduos de Leu<sub>165</sub> e Leu<sub>140</sub> da  $\beta$ -caseína, são também alvo da acção da quimosina, embora estas sejam menos rapidamente hidrolisadas (Michaelidou, *et al.*, 1998; Fox, *et al.*, 2000a). Os péptidos  $\beta$ -CN f1-165 e  $\beta$ -CN f1-140 designados, nomeadamente, por  $\beta$ -II e  $\beta$ -III podem ser facilmente identificados, uma vez que apresentam mobilidade em ureia PAGE (Molina, *et al.*, 2002).

O conteúdo em prolina parece também ter influência, a nível da acção das enzimas proteolíticas. De facto, a caseína contém um número muito mais elevado de resíduos de prolina que a maioria das outras proteínas. A  $\kappa$ -caseína e a  $\alpha$ <sub>2</sub>-caseína contêm ainda cisteína, existindo no leite, como proteínas com ligações S-S. A insensibilidade destas caseínas ao ataque da quimosina no queijo pode estar relacionada com a extensão das ligações cruzadas. O potencial *redox* controla a razão entre as ligações S-S e as ligações S-H nas proteínas e, conseqüentemente, a acessibilidade das ligações susceptíveis. Nos queijos contendo pouco ou nenhum resíduo de coagulante, a plasmina parece ser a responsável pela quebra inicial das caseínas. A plasmina é também uma proteína que contém cisteína e a sua actividade pode estar, conseqüentemente, dependente do potencial redox do queijo (Lawrence, *et al.* 1987).

**Proteólise pós-manufactura** – depois da produção de um queijo, e ao longo da maturação, ocorrem muitas mudanças no seu corpo e aroma. Nesta fase, libertam-se e concentram-se diversos produtos, tais como, aminoácidos, ácidos gordos, metilcetonas, com diferentes comprimentos de cadeia carbonada, lactonas e muitos outros compostos orgânicos, dependendo do tipo de queijo e das condições de maturação (Kosikowski, 1977).

A textura do queijo modifica-se, normalmente, de forma acentuada na primeira, ou segunda semana de maturação, em resultado da hidrólise, pela quimosina, de uma pequena fracção de  $\alpha$ <sub>S1</sub>-caseína, que se converte no peptídeo  $\alpha$ <sub>S1</sub>-I, o que resulta num enfraquecimento da rede de caseína. A posterior mudança relativamente lenta na textura, é determinada, sobretudo, pela taxa de proteólise, que por sua vez, é controlada, principalmente pela proporção de renina residual e de plasmina no queijo, pela razão entre o sal e a humidade e pela temperatura de armazenamento. Quanto mais pequena

for a razão entre a taxa de humidade e a caseína, mais firme será a matriz da caseína no queijo. Pequenas variações na razão entre o nível de humidade e a caseína, têm como resultado mudanças relativamente grandes na quantidade de humidade disponível, uma vez que muita da água está ligada à caseína e aos produtos da sua degradação. Mesmo pequenas diminuições na actividade da água, levam a um grande decréscimo da actividade proteolítica no queijo. Para além disto, a razão entre a renina e a caseína é menor em queijos com baixa humidade e o nível de alterações que ocorrem na textura irá ser, também, menor. O aumento de pH que ocorre durante a maturação é também muito importante em algumas variedades de queijo. A textura do queijo pode também ser afectada se forem utilizados outros coagulantes, para além da quimosina, pela adição de proteases neutras e pela incorporação de proteínas de soro. A elasticidade característica da coalhada depende, sobretudo, do pH e da proporção do fosfato de cálcio coloidal que tenha sido removido (Lawrence, 1987).

Como se verifica, são diversos os factores que afectam a proteólise do queijo, sendo-lhes por isso dado maior destaque no ponto seguinte.

#### 1.3.1.1 - FACTORES QUE AFECTAM A PROTEÓLISE NO QUEIJO

Os principais factores que afectam a proteólise, podem agrupar-se da seguinte forma:

- *Enzimas (renina e quimosina) das culturas de arranque*: durante a maturação de um queijo, os microrganismos predominantes na microflora são os provenientes das culturas de arranque. No entanto, na produção de muitos queijos artesanais, principalmente espanhóis e portugueses, não se recorre a culturas de arranque.

Estas culturas vão diminuindo, à medida que se dá a lise das bactérias ocorrendo, conseqüentemente, a libertação de enzimas intracelulares, principalmente, peptidases. Estas, em conjunto com a quimosina e a proteinase de arranque, hidrolisam as caseínas em peptídeos e aminoácidos, que serão os precursores dos compostos aromáticos.

Assim, quanto mais renina permanecer na coalhada, maior é a proporção de  $\alpha_1$ -caseína hidrolisada pela quimosina (Creamer *et al.*, 1985).

- **Enzimas provenientes de microrganismos não pertencentes às culturas de arranque ou proteínases indígenas do leite:** a maioria dos queijos fabricados a partir de leite cru, ou pasteurizado, contém bactérias ácido-lácticas, cuja origem é o leite, ou o ambiente que são, predominantemente, lactobacilos heterofermentativos facultativos ou obrigatórios. Estas bactérias crescem muito mais rapidamente em uns queijos que noutros, dependendo do teor de humidade e da temperatura. Nos queijos produzidos a partir de leite cru, o seu número é elevado, apresentando um crescimento mais rápido e uma população mais heterogénea, do que nos queijos elaborados com leites pasteurizados (Liu *et al.*, 1998).

O sistema proteolítico da microflora não de arranque parece não contribuir muito para a proteólise primária de alguns queijos, contribuindo, no entanto, para a libertação de aminoácidos livres (Fox *et al.*, 2000c).

Em muitas variedades de queijos, aparece ainda uma microflora secundária, como por exemplo bactérias (*Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Brachybacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Propionibacterium* e *Micrococcus spp.*) e bolores (*Geotrichum candidum*, *Penicillium camemberti* e *P. roqueforti*). Esta microflora tem como função produzir alguma alteração específica no queijo, tal como, crescimento superficial nos queijos de maturação bacteriana, ou produção de CO<sub>2</sub>, proprionato, ou acetato, no caso de outras variedades. Em todos estes queijos, é a actividade metabólica da flora secundária, a principal responsável pelo desenvolvimento do *flavour*.

Como já foi referido anteriormente, o leite contém variadas proteínases indígenas, a principal das quais, a plasmina, que hidrolisa a  $\beta$ -caseína a  $\gamma$ -caseína e protease-peptonas. As proteínases e as peptidases também hidrolisam a  $\alpha_1$ -caseína e a  $\alpha_2$ -caseína (Lawrence *et al.*, 1987).

- **Teor de humidade da coalhada e ao longo da maturação:** é do conhecimento geral que os microrganismos necessitam de água para se desenvolverem. Mas, mais

importante que a quantidade total de água é a acessibilidade desta. Este valor é definido pela actividade de água ( $a_w$ ). Uma vez que as proteínas do queijo são hidratadas, esta água não se encontra disponível para os microrganismos. Por outro lado, a hidrólise dessas proteínas leva à formação de outros produtos que, por sua vez, se vão ligar a moléculas de água, reduzindo ainda mais a actividade da água.

A taxa de maturação varia, assim, de forma directamente proporcional com o conteúdo em humidade existente no queijo, enquanto que a duração da maturação é, mais ou menos, inversamente proporcional ao conteúdo em humidade. Pequenas variações na razão entre humidade e caseína podem alterar, de forma acentuada, a quantidade de água disponível, uma vez que uma parte significativa da água se encontra unida à caseína e aos produtos resultantes da sua decomposição (Lawrence *et al.*, 1987).

Dependendo do tipo de queijo, assim se requer uma determinada temperatura, diferentes tempos de maturação e diferentes níveis de humidade relativa (Park, 2001).

- **pH da coalhada:** o valor de pH afecta a actividade das enzimas, sendo por isso lógico, que a taxa de proteólise dos queijos varie de acordo com as variações de pH. Para comprovar este facto, mediu-se a actividade da renina a diferentes pH, tendo-se verificando um aumento da extensão da proteólise em queijos preparados de forma a apresentarem um pH de 5,8 (Noomen, 1978).

A taxa de degradação da  $\alpha_s1$ -caseína está relativamente aumentada, a um pH baixo, do que a correspondente à da  $\beta$ -caseína. Por outro lado, a  $\beta$ -caseína é mais degradada do que a  $\alpha_s1$ -caseína a um pH superior a 5,6, provavelmente, como resultado do aumento de actividade da plasmina (Lawrence *et al.*, 1987).

Por outro lado, o valor de pH também afecta o desenvolvimento bacteriano. Embora a maior parte das bactérias necessite de um pH perto da neutralidade para se desenvolver em condições óptimas, as bactérias ácido-lácticas desenvolvem-se a um pH inferior a 7. Também a maior parte das leveduras e bolores pode crescer a valores de pH inferior a 3, embora o seu pH óptimo se situe entre 5 e 7. Por seu turno, o valor de pH dos queijos aumenta durante a maturação, sobretudo à superfície, devido ao desenvolvimento de leveduras e bolores (Pinho, 2003).

Como o sistema proteolítico da microflora actua ao longo da maturação de um queijo, as variações de pH, ao condicionarem o crescimento desses microrganismos, podem também afectar a taxa de proteólise.

- **Razão sal/humidade:** o conteúdo em sal, o método de salga e a razão entre o sal e a humidade da coalhada afectam, de forma acentuada, a taxa de proteólise no queijo (Park, 2001).

De facto, como é do conhecimento comum, há já milhares de anos que o Homem recorre ao método de salgar os alimentos, como forma de os conservar. O maior factor inibidor do crescimento bacteriano é, provavelmente, a diminuição do valor da actividade da água ( $a_w$ ). Contudo, ao determinar o efeito inibidor do sal no queijo, é mais importante a concentração de sal dissolvido na água do queijo, do que a concentração real do sal (Sung e Collins, 2000).

Num trabalho publicado, sobre o queijo *Cheddar*, observou-se uma relação inversamente proporcional entre as taxas de degradação da  $\alpha_s$ -caseína e a  $\beta$ -caseína e a razão sal/humidade (Thomas e Pearce, 1981).

O método da salga é ainda um factor a ter em conta. O queijo pode ser salgado de duas formas: a seco, como é o caso do queijo *Cheddar*, ou em salmoura, como acontece na maioria dos queijos. Neste caso, a concentração de sal no queijo vai depender do seu tamanho, da temperatura e concentração da salmoura e do período em que o queijo fica imerso. A velocidade e a taxa de difusão do sal, no queijo, é também um aspecto importante. Assim, a prensagem da coalhada vai influenciar este factor, no sentido em que, alterando-se a porosidade da massa, se altera a dispersão da salmoura (González *et al.*, 1999).

- **Tempo de maturação e temperatura:** um aumento de 10°C na temperatura tem um efeito significativo na textura, embora o maior efeito seja a nível do desenvolvimento do *flavour*. Verifica-se, no entanto que, quanto maior a temperatura, maior a extensão da hidrólise da caseína e maiores alterações se produzem a nível da textura (Park, 2001).

Num estudo feito com queijo *Cheddar* (Fedrick e Dulley, 1984), verificou-se que o queijo amadurecido a 15°C adquiria, em 8 semanas, uma textura equivalente à desenvolvida em 16 semanas, quando a temperatura de maturação era de 8°C. Com o aumento da temperatura de armazenamento acima dos 20°C, o queijo tornou-se mais quebradiço e menos elástico. Alguns estudos demonstraram que a proteólise aumenta, sinergicamente, com o aumento da temperatura e o tempo de maturação (Park, 2001).

### 1.3.1.2 - MÉTODOS ANALÍTICOS PARA AVALIAR A PROTEÓLISE NOS QUEIJOS

São vários os métodos que têm sido usados na tentativa de avaliar a proteólise sofrida pelo queijo, durante a maturação. Estes podem dividir-se em 4 grupos, segundo a metodologia utilizada: *i)* solubilidade dos peptídeos e aminoácidos em vários solventes ou agentes precipitantes; *ii)* libertação de grupos funcionais reactivos; *iii)* várias modalidades de cromatografia e *iv)* de electroforese (Park, 2001).

**Métodos não específicos** – Baseiam-se na solubilidade de famílias de compostos azotados em vários solventes e/ou precipitantes, e em que a concentração final é, posteriormente, determinada por espectrofotometria ou titulação pelo método de *Kjedahal*. Estas técnicas permitem obter uma informação condensada sobre a proteólise, fornecendo informações globais sobre a extensão da mesma e sobre a actividade proteolítica dos vários agentes.

A solubilidade do nitrogénio em condições definidas, tais como precipitação fraccionada ou solubilização de compostos, é o método mais utilizado para determinar a proteólise (Sørensen e Benfeldt, 2001; Pietro *et al.*, 2000; Farkye e Fox, 1990, Loewenstein *et al.*, 1980).

Dependendo do método analítico utilizado no fraccionamento da fracção azotada, assim são usados diferentes solventes e/ou precipitantes, como se pode verificar na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição das fracções azotadas obtidas por diferentes métodos de extracção líquida e/ou precipitação

Agentes de Extracção Líquida/Precipitação	Componentes na Fracção Solúvel
<p>Água</p> <p>Ácido (pH 4,6)</p> <p>Cloreto de Cálcio</p> <p>Cloreto de Sódio</p>	<p>Proteínas, peptídeos e aminoácidos</p>
<p>Clorofórmio-metanol</p> <p>Metanol-diclorometano-água</p>	<p>Peptídeos hidrofóbicos</p>
<p>Ácido tricloroacético</p> <p>Etanol</p> <p>Ácido sulfossalicílico</p>	<p>Peptídeos e aminoácidos</p>
<p>Ácido fosfotúngstico</p>	<p>Peptídeos pequenos e aminoácidos</p>

(retirado de Sousa e Malcata, 1997)

A degradação das proteínas pode também ser medida através da monitorização da libertação no queijo, de aminoácidos ou grupos carboxilo, através da reacção com ácido trinitrobenzenosulfónico (Samples *et al.*, 1984), ou ninidrina (Ordóñez e Burgos, 1977).

Estes reagentes permitem determinar os produtos formados, em resultado da proteólise, através da formação de grupos amino com o queijo, ou com as suas fracções, não dependendo do efeito indirecto da solubilidade em alguns solventes particulares (Fox, 1989).

No entanto, a caracterização completa da proteólise do queijo requer o isolamento, identificação e quantificação das substâncias formadas.

Quando se pretende caracterizar o processo de degradação da caseína, durante a maturação, é necessário recorrer a técnicas que permitam a separação e detecção dos peptídeos que se formam. Com este propósito, recorre-se cada vez mais a métodos específicos que se baseiam em técnicas electroforéticas ou cromatográficas, que permitam identificar e caracterizar, individualmente, os peptídeos e os aminoácidos formados (Rank *et al.*; 1985; Sousa e Malcata, 1997).

**Métodos específicos** – São várias as técnicas a que se pode recorrer com este propósito mencionando-se, de seguida, alguns exemplos:

**Técnicas cromatográficas** - A cromatografia é fundamentalmente um processo de separação por migração diferencial. A IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) define a cromatografia como um método usado essencialmente na separação de componentes de uma amostra, no qual os componentes se distribuem entre duas fases, uma estacionária e outra móvel.

A fase estacionária pode ser empacotada numa coluna, espalhada em camada, distribuída como um filme, etc. A fase móvel pode ser líquida ou gasosa (Ettre, 1980).

Numa cromatografia líquida típica, a fase estacionária ou suporte, na forma de partículas esféricas, porosas ou não, encontram-se empacotada numa coluna. A mistura de substâncias a separar é injectada no topo da coluna, sob a forma de um pulso curto, promovendo-se então a passagem de uma corrente líquida através dessa coluna, à qual se dá o nome de eluição. Consoante o tipo de cromatografia estabelecem-se então determinadas interações entre os solutos e a fase estacionária: electrostáticas, hidrofóbicas, de afinidade e estereoquímicas (Prazeres, 1995).

De acordo com a natureza das substâncias a separar e dos suportes, as interações serão mais ou menos fortes, originando velocidades de migração diferentes. Como consequência, essas substâncias deixam a coluna com tempos de retenção

diferentes, obtendo-se um cromatograma. A diferença entre os tempos de retenção será tanto maior, quanto maior for a selectividade da fase estacionária para as substâncias em questão (Prazeres, 1995).

O processo de eluição, por seu turno, pode ser efectuado de duas maneiras distintas: eluição isocrática e de gradiente. Na primeira, a composição do eluente é constante, não se alterando a intensidade das interacções entre as substâncias a separar e a fase estacionária. No segundo caso, a composição do eluente varia contínua ou descontinuamente, permitindo assim modificar a intensidade das interacções (Prazeres, 1995).

Dependendo do tipo de cromatografia, podem utilizar-se gradientes de pH, força iónica (Cromatografia de Permuta Iónica e Cromatografia de Interação Hidrofóbica), polaridade (Cromatografia de Interação Hidrofóbica e Cromatografia de Fase Reversa). Com uma eluição de gradiente pretende-se, normalmente, melhorar a separação e reduzir o tempo de processo (Wankat, 1990).

O fenómeno de migração diferencial permite obter tempos de retenção diferentes, contribuindo para a resolução ou separação entre dois solutos. Este efeito é, no entanto, contrariado por um conjunto de fenómenos (difusão, transferência de massa, difusão turbulenta), conhecidos globalmente como dispersão. Esta provoca um espalhamento dos solutos na coluna, contribuindo para o alargamento dos picos no cromatograma, diminuindo a resolução. Uma das formas de contrariar este processo consiste em utilizar partículas de suporte mais pequenas e com poros maiores. O aumento da resolução conseguido permite, por seu turno, aumentar a velocidade de eluição e, conseqüentemente, acelerar o processo. No entanto, qualquer redução no diâmetro das partículas, obriga o sistema a operar a pressões hidrodinâmicas mais elevadas. Este tipo de cromatografia efectuado a altas pressões é conhecido por HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), e permite aumentar o poder de resolução e a velocidade de separação relativamente à cromatografia convencional (Prazeres, 1995).

Diversas metodologias de HPLC em fase reversa e outras por interacções hidrofóbicas têm sido utilizadas por diferentes autores, na análise de peptídeos, aminoácidos e aminas biogénicas presentes nos produtos lácteos, de forma a caracterizar a proteólise de queijos, tal como mostram os seguintes trabalhos:

Sørensen e Benfeldt (2001) conduziram um estudo recorrendo, entre outros métodos, a RP-HPLC para a análise de peptídeos, com o objectivo de caracterizar a proteólise de queijos *Danbo* e de forma a distinguir queijos provenientes de duas queijarias. A formação de peptídeos solúveis a pH 4,6 foi monitorizada através da análise por RP-HPLC de amostras preparadas a partir de queijos com 10 semanas de maturação. Posteriormente, procedeu-se à análise estatística, tendo cada cromatograma sido dividido em secções e integrado. Os dados obtidos foram utilizados na análise multivariada.

A proteólise do queijo conduz à formação de aminoácidos livres e de aminas biogénicas, constituintes que afectam as características do produto e as suas propriedades organolépticas, podendo ser usadas como indicadores de qualidade. Neste sentido, Pinho *et al.* (2001a), modificaram a metodologia desenvolvida por Krause *et al.* (1995), de forma a otimizar a técnica de análise de aminoácidos livres e de aminas biogénicas em queijos, com derivatização com cloreto de dabsilo. As condições cromatográficas escolhidas permitiram, simultaneamente, a separação e quantificação de um grande número de aminoácidos livres e aminas biogénicas, com elevada reprodutibilidade. Esta metodologia tem sido aplicada com êxito em estudos de maturação de queijo de Azeitão (Pinho *et al.*, 2001a) e de queijo *Terrincho* (Pinho *et al.*, 2004a).

A análise de aminoácidos em queijos também foi realizada por Poveda *et al.* (2004). No entanto, estes autores recorreram à cromatografia de troca iónica, com derivatização pós-coluna e detecção colorimétrica. Desta forma, estudaram o conteúdo de aminoácidos presentes em queijo *Manchego*, manufacturado com diferentes culturas de arranque e avaliaram as alterações ao longo da maturação. Os dados foram tratados estatisticamente, através da Análise de Componentes Principais. Esta análise aplicada a 3 tipos de queijo *Manchego* com diferentes tempos de maturação, dividiu a amostra em 2 grupos principais: queijos com curto período de maturação (15 e 45 dias), com baixa concentração de Phe, Val, Leu, Cys and Tyr, e queijos com períodos de maturação longo (90 e 150 dias), com elevado conteúdo destes aminoácidos livres. A variação no tempo de maturação pareceu ser mais importante que o tipo de cultura de arranque, na diferenciação de amostras com base no seu conteúdo em aminoácidos livres.

*Técnicas electroforéticas* - Estas técnicas baseiam-se na migração de moléculas carregadas, em solução, sob acção de um campo eléctrico. Todas as proteínas são constituídas por grupos com carga positiva e negativa, possuindo uma carga global não nula, excepto no seu pH isoeléctrico. Quando uma proteína é submetida a um campo eléctrico, migra de acordo com a sua carga global e o seu peso molecular, em direcção ao ânodo ou ao cátodo (Guillou *et al.* 1986).

São vários os suportes que se podem utilizar na electroforese, tais como, géis de amido, poliacrilamida, agarose, ou poliacrilamida/agarose e acetato de celulose. No entanto, os mais frequentemente utilizados na análise de proteínas são os géis de poliacrilamida.

Os métodos electroforéticos apresentam a grande vantagem de permitirem a separação, identificação e, nalguns casos, a quantificação simultânea das diferentes proteínas de uma mistura. Depois da separação, as diferentes bandas podem ser identificadas recorrendo a corantes como o azul de *Coomassie* ou o nitrato de prata. Estes permitem, não só uma identificação qualitativa dos grupos de proteínas, mas também uma quantificação aproximada, utilizando um densitómetro, no comprimento de onda correspondente à absorção do corante (James, 1995).

A *electroforese na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)* é uma técnica que permite a separação das proteínas em função da sua massa molecular, uma vez que o SDS (detergente aniónico que se liga fortemente às proteínas sobretudo por interacções hidrofóbicas) confere a mesma carga a todas elas (Strange *et al.*, 1992).

A *electroforese em géis de poliacrilamida na presença de ureia (ureia-PAGE)* tem uma resolução similar à da SDS-PAGE, contudo a técnica de Ureia-Page é mais facilmente aplicada, pelo que se tornou na técnica *standard* no caso da análise de caseínas (Fox e MacSweeney, 1998).

A técnica de *focagem isoeléctrica* difere da electroforese convencional no sentido em que a separação das proteínas se produz num gradiente de pH. A região anódica é mantida a um pH inferior ao da região catódica, estabelecendo-se um gradiente estável com a utilização de substâncias anfotéricas. As proteínas que se encontram inicialmente em zonas de pH inferior ao seu ponto isoeléctrico estão carregadas positivamente, migrando em direcção ao cátodo. Quando a proteína atinge o

seu ponto isoeléctrico, adquire uma carga nula, pelo que a sua migração cessa, precipitando. A separação das proteínas por esta técnica depende apenas do ponto isoeléctrico das mesmas e não da sua massa molecular ou da sua carga (James, 1995).

A separação de proteínas de acordo com o seu ponto isoeléctrico é particularmente apropriada para a análise de caseínas, uma vez que estas apresentam variantes genéticas quer na mesma espécie, quer em espécies diferentes. Este método é também utilizado com sucesso na detecção de alterações provocadas pelos tratamentos térmicos nas proteínas do soro (Strange *et al.*, 1992).

A técnica de *electroforese bidimensional* consiste em duas electroforeses: a primeira, uma focagem isoeléctrica, seguida de outra na presença de SDS. Desta forma, é possível realizar a separação de proteínas com base em duas propriedades diferentes – ponto isoeléctrico e peso molecular. Esta técnica é utilizada para se conseguir uma melhor separação de misturas proteicas extremamente complexas (Grappin e Ribadeau-Dumas, 1992).

A *electroforese capilar* é uma técnica em que a separação das substâncias é feita numa coluna capilar cheia de uma solução electrolítica que permite a aplicação de voltagens elevadas (10-30 kV) no seu interior. Esta coluna, normalmente feita de sílica fundida, poderá ser oca ou cheia com uma matriz de gel. As suas extremidades são colocadas em reservatórios com a solução electrolítica, onde são colocados também eléctrodos de material inerte como a platina, para completar o circuito eléctrico.

A migração da amostra dentro da coluna capilar é conduzida pelo campo eléctrico criado. A detecção é, normalmente, conseguida por absorvância no UV ou, menos frequentemente, por fluorescência.

Podem referir-se, como exemplo, os seguintes trabalhos que recorreram às técnicas electroforéticas, de forma a caracterizar a proteólise do queijo:

Sørensen e Benfeldt (2001) caracterizaram queijos da variedade *Danbo*, provenientes de 2 queijarias diferentes. O objectivo deste trabalho foi investigar se existiam diferenças sistemáticas nas características da maturação e, por conseguinte, na qualidade. Com este propósito, recorreram a vários métodos, de entre os quais se destaca a electroforese capilar, tendo esta sido utilizada para avaliar a extensão da

degradação da caseína. A análise foi conduzida recorrendo ao método desenvolvido por de Jong, Visser e Olieman (1993), com pequenas modificações de Benfeldt *et al.* (1997). Foram determinadas as seguintes fracções de caseína: p- $\kappa$ -caseína,  $\alpha_{S1}$ - caseína 8P,  $\alpha_{S1}$ - caseína 9P,  $\alpha_{S2}$ - caseína,  $\beta$ -caseína A1,  $\beta$ -caseína A2,  $\alpha_{S1}$ -I caseína 8P e  $\alpha_{S1}$ -I caseína 9P. Utilizou-se a Análise de Componentes Principais para relacionar os dados obtidos pelos diferentes métodos: electroforese capilar (caseína), HPLC (peptídeos), GC (compostos aromáticos), análise química e sensorial. A Análise de Componentes Principais permitiu distinguir os queijos provenientes das duas queijarias. Este estudo foi produzido como parte de um projecto de transferência da produção de queijo *Danbo* com a sua marca registada de uma queijaria para outra.

Veloso *et al.* (2004) recorreram à técnica de electroforese em SDS-PAGE para avaliar a autenticidade e a proteólise de queijo. Conseguiram uma boa resolução das caseínas extraídas dos queijos em estudo. Ao longo do tempo de maturação, verificou-se uma intensificação da banda com maior mobilidade electroforética, resultante da proteólise da  $\alpha$ -caseína. A análise densitométrica dos resultados electroforéticos dos queijos de ovelha mostrou que a  $\alpha$ -caseína decresceu significativamente durante a maturação, enquanto se observou apenas um ligeiro decréscimo da  $\beta$ -caseína. A caseína bovina permaneceu praticamente constante ao longo dos 30 dias de maturação.

### 1.3.2 – LIPÓLISE

Como se viu anteriormente, a concentração de ácidos gordos saturados de cadeia curta (C4:0 a C12:0) é muito maior no leite de ovelha (20%), quando comparada com o leite de vaca (12%). A proporção mais elevada de ácidos gordos, tais como o capríco, caprílico e cáprico neste leite, em relação ao leite de vaca (mas menor que no leite de cabra) confere ao leite de ovelha o seu sabor e aroma característicos, ao mesmo tempo que outros componentes, tais como fosfolípidos e fenóis, dão também um contributo importante (Kim Ha e Lindsay, 1991).

Os lípidos têm um papel fundamental no *flavour* e na textura do queijo. Contudo, a sua maior contribuição no desenvolvimento destas características, é o facto

de sofrerem lipólise, originando, conseqüentemente, produtos que resultam da sua degradação (Pinho, 2003).

Os queijos produzidos com leite de ovelha, devem o seu aroma característico, principalmente, aos ácidos gordos livres de cadeia média e curta, os quais são constituintes importantes da fracção volátil (Qian e Reineccius, 2002; Thyerry e Maillard, 2002; Chamba e Perreard, 2002).

Em algumas variedades de queijos, os ácidos gordos podem dar origem a outros compostos que também contribuem para o sabor e aroma, principalmente metilcetonas e lactonas. Além disso, os ácidos gordos poliinsaturados podem sofrer ranço oxidativo, levando à formação de vários aldeídos insaturados, os quais têm um forte *flavour*.

Por outro lado, os ácidos gordos funcionam como solvente de compostos aromáticos, em consequência da degradação de lípidos, proteínas e hidratos de carbono, embora algumas vezes possam reter aromas e sabores indesejáveis.

A lipólise é, particularmente, importante nos queijos produzidos a partir de leite cru, como é o caso do queijo *Terrincho*, podendo ser notada pelo sabor forte característico destes, que se deve não só ao elevado conteúdo em lípidos, como também à actividade das lipases (Sablé e Cottenceu, 1999; Gomez-Ruiz *et al.*, 2002; Larreyoz *et al.*, 2002).

Segundo Park (2001), a lipólise pode ser classificada em:

**Lipólise induzida** - São vários os aspectos que podem influenciar este processo no leite, tais como: *i)* factores do processamento, como agitação, homogeneização, activação por alterações de temperatura, congelação e descongelação; *ii)* temperatura durante o transporte, armazenagem e processamento; *iii)* factores relacionados com as unidades de produção de leite e de queijo, tais como, sistemas de ordenha, armazenamento, mistura, separação e refrigeração (revisão efectuada por Park, 2001).

**Lipólise Espontânea** - A lipólise espontânea pode ocorrer devido a dois factores principais: *i)* aspectos relacionados com o processamento do leite, como arrefecimento, mistura e separação, em que ocorra ruptura da membrana dos glóbulos

de gordura do leite; *ii*) aspectos relacionados com o animal produtor de leite, como por exemplo, fase da lactação, alimentação, época do ano, raça, existência de mastites, quantidade de leite e de gordura produzida e factores fisiológicos refrigeração (revisão efectuada por Park, 2001).

**Lipólise Microbiológica** – Muitos microrganismos que contaminam o leite e derivados são lipolíticos, produzem lipases e podem levar ao aparecimento de sabor a ranço. As bactérias psicotróficas são a fonte mais comum destas lipases. As lipases de origem bacteriana são diferentes das lipases do leite, não sendo destruídas por pasteurização e podendo atacar os glóbulos de gordura do leite, mesmo que estes estejam intactos (revisão efectuada por Park, 2001).

#### 1.3.2.1 - FACTORES QUE AFECTAM A LIPÓLISE E A OXIDAÇÃO DE LÍPIDOS NO QUEIJO

A composição e integridade dos lípidos é importante para o desenrolar da maturação e para a qualidade final dos queijos. São vários os aspectos que condicionam a lipólise e a oxidação dos lípidos nos queijos, podendo agrupar-se nos seguintes grupos (Park, 2001):

**Ácidos gordos livres** – Já num trabalho publicado em 1963, Kolar e Mickle, mostraram haver uma correlação entre o conteúdo em ácidos gordos livres, a acidez da gordura e o sabor a ranço no queijo. A presença de grandes quantidades de ácidos gordos facilita a ocorrência de oxidação dos lípidos (Fennema, 1996).

**Microrganismos lipolíticos e enzimas** – As lipases são hidrolases que degradam os ésteres dos ácidos carboxílicos, apresentando especificidade para ácidos gordos de um determinado comprimento de cadeia. Estas enzimas podem existir já no leite (lipases indígenas), na coalhada, ou terem origem microbiana.

A maioria das lipases indígenas do leite estão associadas a micelas de caseína onde a gordura aparece sob a forma de glóbulos rodeados de uma membrana de lipoproteína (membrana dos glóbulos gordos do leite). Assim, o substrato da enzima só passa a estar acessível a esta e a lipólise só ocorre quando a membrana dos glóbulos é danificada por agitação, formação de espuma ou congelação (Pinho, 2003).

Uma mungidura incorrecta, ou um mau manuseamento do leite, podem levar a um aumento da lipólise, devido à ocorrência de danos na superfície da membrana dos glóbulos gordos. Este facto pode levar ao aparecimento de compostos indesejáveis, no queijo e noutros produtos lácteos (Fox *et al.*, 2000a).

Embora a maioria das lipases estejam associadas às micelas da caseína, existe no leite uma lipase bem caracterizada que é uma lipoproteína (LPL). Esta lipase lipoproteica é pouco específica para os ácidos gordos, actuando preferencialmente sobre os triglicerídeos, a nível das posições sn1 e sn3. Assim, a lipólise do leite leva à libertação preferencial de ácidos gordos de cadeia curta e média, os quais estão, predominantemente, esterificados nos triglicerídeos, na posição sn3. A LPL é sensível ao calor, sendo inactivada pela pasteurização. É, por isso normal, que ocorra mais lipólise no queijo preparado a partir de leite cru, que de leite pasteurizado (Pinho, 2003).

Embora o coalho de boa qualidade não costume apresentar actividade lipolítica, existem algumas lipases que são provenientes da coalhada. É o que acontece na pasta de coalho utilizada na produção de algumas variedades de queijo italiano duro (*Romano Provolone*), a qual contém uma lipase potente e uma esterase pré-gástrica que são responsáveis pela lipólise extensa e pelo sabor pungente, característico deste tipo de queijos (revisto por Nelson *et al.*, 1977).

Como já foi referido, as lipases podem ser, ainda, de origem microbiana. O *Lactococcus spp.* e o *Lactobacillus spp.* apresentam uma actividade lipolítica mais reduzida que outros agentes, tais como *Pseudomonas* e bolores. No entanto, no caso de existirem em quantidades elevadas e durante um período de tempo longo, como acontece durante a maturação, as suas lipases e esterases passam a ser as principais responsáveis pela lipólise.

Os microrganismos psicrotóficos, que em geral dominam a microflora do leite refrigerado, são uma fonte importante de lipases. Contudo, não se lhes atribui grande

importância, salvo se a sua concentração ultrapassar os  $10^7$  cfu/ml. No entanto, as lipases provenientes destes microorganismos são adsorvidas pelos glóbulos gordos e permanecem no queijo. Além disso, como algumas das lipases psicotróficas são estáveis ao calor, podem então provocar o aparecimento de ranço, ao longo do período de maturação (Santos e Barbano, 2003).

Também alguns microorganismos que fazem parte da microflora «não de arranque» do queijo, como por exemplo, os *micrococcus*, produzem lipases que podem contribuir para a lipólise, durante a maturação (Browmik e Marth, 1990a ,1990b).

**Temperatura e tempo de armazenamento** – A temperatura acelera o processo de maturação de um queijo, incluindo a lipólise. Além disso, a oxidação lipídica também aumenta com o tempo de armazenamento (Jin e Park, 1995).

**Nível de humidade** – A taxa de oxidação dos lípidos depende, em larga medida da actividade da água.

**Oxidantes e anti-oxidantes** – Se a quantidade de oxigénio é ilimitada, a taxa de oxidação lipídica é independente da concentração deste. No entanto, se a concentração de oxigénio é baixa, a taxa de oxidação passa a ser bastante proporcional à quantidade deste. Por outro lado, os antioxidantes são substâncias que atrasam a ocorrência, ou tornam mais lenta, a taxa de oxidação dos lípidos do queijo (Fennema, 1996).

#### 1.3.2.2 - MÉTODOS ANALÍTICOS PARA AVALIAR A LIPÓLISE NO QUEIJO

Estes métodos incluem a determinação de:

**Valor de peróxido (POV)** – Este valor é calculado através da titulação do extracto lipídico com uma solução padrão de sulfato de sódio, em presença de

indicador. O valor determinado é expresso em termos de miliequivalentes de oxigénio por kilograma de gordura (AOAC, 1984).

**Ácido tiobarbitúrico (TBA)** – O valor de TBA representa os miligramas de malonaldeído formado por 1000g de amostra (revisão efectuada por Park, 2001), o qual indica a extensão da oxidação lipídica. Os produtos de oxidação dos sistemas insaturados produzem uma coloração vermelha por reacção com o TBA. O cromatogéneo resulta da condensação de duas moléculas de TBA com uma moléculas de malonaldeído (Fennema, 1996).

### ***Quantificação de ácidos gordos livres***

O conteúdo em ácidos gordos livres num queijo pode ser determinado pelos seguintes métodos:

*i)* Índice de Ácido – Define-se como o número de miligramas de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos livres de 1 grama de amostra (Costa, 1994).

*ii)* Valor total de ácidos gordos livres – Na literatura estão descritas diferentes metodologias analíticas para a quantificação de ácidos gordos livres. Estas incluem HPLC (Garcia *et al.*, 1990), electroforese capilar (Vallejo-Cordoba *et al.*, 1998) e cromatografia gasosa. Esta última é, de todas as técnicas referidas, a que mais se adequa a esta determinação. Nesta técnica a amostra, no caso de não se tratar de um gás, é inicialmente volatilizada, sendo posteriormente arrastada por um gás arrastador, através da coluna. Este gás deve ser inerte, de modo a que não reaja nem com a amostra, nem com a fase estacionária. Os gases arrastadores mais frequentemente usados são o hélio, o azoto e o argón. Este gás tem pouca influência no processo de separação, importando para esta, a volatilidade do composto a separar e o tipo de interacção com a fase estacionária (Gonçalves, 1990).

Estão descritos trabalhos que recorrem à cromatografia gasosa com o objectivo de quantificar ácidos gordos livres em queijo:

Partidário e Calhau (1999) recorreram à cromatografia gasosa para dosear o teor de isómeros de ácidos gordos insaturados num queijo de leite de vaca, com período de maturação relativamente longo – queijo de São Jorge – e verificar quais as relações entre o teor de isómeros *trans*, com o tempo de maturação e também com a época de produção. Neste trabalho, depois de extraída a gordura com uma mistura de éter etílico e éter de petróleo, procedeu-se à metilação dos ácidos gordos constituintes, com solução metanólica de KOH (2N), tendo os ésteres metílicos sido posteriormente analisados por cromatografia Gás-Líquido, com detector de ionização de chama.

Contudo, é importante implementar novos métodos de extracção para a determinação de ácidos gordos livres em queijo, pois dela depende a exactidão da quantificação (de Jong e Badings, 1990). Neste sentido, Pinho *et al.* (2003a, 2003b) utilizaram a Cromatografia Gasosa, associada à Espectrometria de Massa (GC-MS), para a análise dos compostos voláteis de queijos *Terrincho* depois de feita a extracção destes compostos por SPME (microextracção em fase sólida). Esta técnica de extracção para ácidos gordos livres em queijos, tem sido utilizada por vários investigadores (Pinho *et al.*, 2001b; González e Vallejo, 2001; Pinho *et al.*, 2002). Revelou-se uma técnica útil, no sentido em que os compostos voláteis estão presentes em quantidades vestigiais no queijo, pelo que se requer o seu isolamento e concentração para a subsequente análise por cromatografia gasosa. Esta metodologia permitiu a diferenciação de queijos de ovelha *Terrincho*, com 30 dias de maturação, mas provenientes de produtores diferentes.

#### 1.4 - AVALIAÇÃO SENSORIAL DA TEXTURA E DO *FLAVOUR* DO QUEIJO

A qualidade sensorial dos produtos alimentares é um atributo importante, no sentido em que condiciona as primeiras impressões percebidas pelos consumidores. No caso dos queijos tradicionais e dentro destes, nos queijos de ovelha, este aspecto define, em larga medida, a sua aceitação e procura e, por conseguinte, o seu valor comercial.

Contudo, os regulamentos que definem as características dos queijos com DOP mencionam, de uma maneira geral, as características sensoriais destes produtos de uma forma vaga e pouco precisa.

Uma vez que a qualidade sensorial de um produto não pode ser avaliada, recorrendo apenas a métodos químicos e instrumentais, torna-se necessário utilizar outras “ferramentas”, como sejam os sentidos humanos, para proceder à dita avaliação. È por este motivo que a análise sensorial é imprescindível, quando se pretende relacionar todos os factores que contribuem para a percepção completa da qualidade global de um queijo. Na literatura encontram-se descritos diversos trabalhos recentes que recorrem à análise sensorial para uma melhor caracterização do queijo (Bustamante, *et al.*, 2003; Bárcenas *et al.*, 2004; Barron *et al.*, 2005; Hannon *et al.*, 2005; Ritvanen *et al.*, 2005).

A análise sensorial descritiva envolve a detecção (discriminação) e a descrição qualitativa e quantitativa, por um painel treinado de pessoas, dos componentes sensoriais característicos de um produto de consumo. A avaliação qualitativa desse produto pode incluir atributos muito diversos como o aroma, a aparência, o *flavour*, a textura, o sabor residual e as propriedades de som, que o permitem distinguir de outros. Os provadores quantificam esses aspectos nos produtos, de forma a facilitar a descrição dos atributos percebíveis (Murray *et al.*, 2001).



Existem diferentes métodos de análise descritiva que incluem, entre outros, o Perfil do *Flavour*, o Perfil de Textura e a Análise Descritiva. Cada um dos métodos existentes reflecte várias correntes da análise sensorial e diferentes tipos de abordagens.

O *Método de Perfil de Flavour* usa um painel de 4-6 painelistas que são treinados para definir com precisão os *flavours* das diferentes categorias de produtos num período de 2-3 semanas. O critério de selecção para este tipo de análise é muito rigoroso. O painel é então exposto a uma ampla gama de amostras dentro da categoria do produto e durante o treino, revêm e refinam o vocabulário do *flavour* (Murray *et al.*, 2001).

O *Método de Perfil de Textura* baseia-se nas propriedades de textura que apresentam os alimentos e que se dividem em três grupos: mecânicas, geométricas e outras. Este método tem como objectivo a descrição da textura desde a primeira dentada até à completa mastigação, tendo também em conta o aspecto temporal do atributo. Os atributos são colocados em escalas desenvolvidas por Szczesniak (1963), de forma a abranger as sensações produzidas pelos alimentos, estando os pontos das escalas ancorados a produtos alimentares específicos (Murray *et al.*, 2001). São treinados um mínimo de 10 painelistas, por um período de cerca de 130 horas, ao longo de 6-7 meses. Esta quantidade de indivíduos pode ser percebida como uma desvantagem, contudo este facto conduz a resultados de grande consistência e precisão (Murray *et al.*, 2001).

O *Método de Análise Descritiva Quantitativa* baseia-se no princípio que os indivíduos que são consumidores frequentes de determinado produto são mais sensíveis às diferenças entre os vários produtos e, por conseguinte, são mais discriminantes. A linguagem utilizada neste método é uma linguagem não-técnica, quotidiana, de forma a não confundir os conceitos. O painel treina por um período de 10-15 horas de forma a entender o significado dos atributos. Contudo, uma limitação desta técnica deve-se ao facto de ser difícil comparar resultados entre painéis, laboratórios, ou diferentes períodos de tempo (Murray *et al.*, 2001).

Deste modo, a análise sensorial pode definir-se como o conjunto de procedimentos que se utilizam para recordar, medir, analisar e interpretar as reacções às características dos alimentos, tais como são percebidas pelos sentidos da visão, olfacto, paladar, tacto e audição (IFT, 1981). Embora exista uma grande variedade de queijos e

estes apresentem características particulares, a Norma Internacional para Avaliação Sensorial de Produtos Lácteos fornece indicações gerais, em relação ao tipo de apreciação que deve ser feita aos queijos (IDF, 1987).

Uma vez que na análise sensorial os provadores funcionam como um instrumento de medição dos atributos sensoriais, a avaliação do seu grau de credibilidade é um passo obrigatório em qualquer estudo de análise sensorial (McEwan *et al.*, 2002). Assim, numa análise sensorial é importante ter em conta a capacidade dos painelistas em detectar diferenças nos produtos e a repetibilidade e concordância dentro do grupo, na percepção dessas diferenças (Stone e Sidel, 1993).

Todos os métodos descritivos requerem um painel com um certo grau de treino ou orientação. Na maior parte dos casos, os provadores devem ser possuidores de um nível razoável de acuidade sensorial (Murray *et al.*, 2001).

Um aspecto importante para o sucesso da análise é a motivação dos provadores. Da mesma forma, é importante elaborar um questionário sobre os hábitos alimentares dos candidatos e conhecer os alimentos a que são alérgicos, ou pelos quais sentem repugnância.

Durante o treino, é importante familiarizar os provadores com os atributos do produto em análise.

Conclui-se com isto, que a avaliação sensorial dos alimentos é um processo muito complexo, tanto na dificuldade em treinar e a manter o painel de provadores, como no facto de ser um método moroso, que se reflecte numa baixa resposta em tempo útil. Para além disto, o tratamento estatístico dos resultados envolve sempre alguma complexidade.

Contudo, a maior crítica à análise sensorial é de que mesmo que se parta do princípio que as palavras representam exactamente a sensação notada, ao agrupar os elementos sensoriais individuais pode não se transmitir necessariamente a mesma impressão original (Murray *et al.*, 2001). Para além deste facto, verifica-se ainda a necessidade de uniformizar a linguagem, de forma a permitir a comunicação e o comércio internacionais (Drake *et al.*, 2005). Uma linguagem existente pode ser adoptada por um novo painel, contudo se esta foi desenvolvida num laboratório, ou país

ou região diferente podem surgir dificuldades na compreensão e interpretação dos termos. Além disso, é importante estabelecer se o perfil sensorial descritivo elaborado pelo painel está concordante com o esperado e avaliar se os membros de cada painel estão em consonância uns com os outros e com o consenso global.

Os produtores de queijo devem conhecer os factores que contribuem para as propriedades organolépticas dos queijos, nomeadamente a textura, de forma a produzir produtos da melhor qualidade (revisão efectuada por Foegeding *et al.*, 2003). Embora a textura dos diferentes tipos de queijo seja diversa, os factores que determinam as alterações nas várias qualidades de queijos são, basicamente, os mesmos. Na realidade, os componentes de todos eles – renina, enzimas nativas de leite, ácido láctico, caseínas, humidade, cloreto de sódio, gordura, cálcio – são os mesmos, mudando apenas a sua proporção (Lawrence *et al.*, 1987).

Existem já vários trabalhos publicados sobre o queijo *Terrincho*, correlacionando as suas características sensoriais com os resultados obtidos no estudo da fracção volátil deste tipo de queijo (Pinho, 2003; Pinho *et al.*, 2001b, 2003a, 2004b). Contudo, neste trabalho, procurou-se por outro lado, correlacionar a origem do leite e a composição em caseína com as características organolépticas dos queijos *Terrincho*, de vaca e de mistura.

## 1.5. AUTENTICIDADE DO QUEIJO

Pode definir-se «Adulteração» como o acto de falsificar, tornar impura uma determinada substância pela adição de substâncias estranhas ou de valor inferior, ou preparar qualquer produto para consumo, substituindo ingredientes mais valiosos, por outros de valor inferior.

Este não é um problema recente, pois sempre houve, ao longo dos séculos, indivíduos menos escrupulosos que não hesitavam em falsificar os produtos por si produzidos ou comercializados, de forma a obter maiores proveitos, tomando-se como exemplo a adição de água a leite ou a vinho. No entanto, com o aprofundamento dos conhecimentos científicos e com o desenvolvimento de novos métodos analíticos, bem como, com o surgimento de sociedades cada vez mais complexas e exigentes, este assunto tornou-se uma questão fundamental na vida das pessoas, sobretudo quando se trata de bens alimentares.

Se por um lado existe a necessidade de garantir a liberdade comercial, de prevenir a especulação económica, de obter alimentos o mais adaptados possíveis às necessidades alimentares individuais, assegurando sempre a segurança e os direitos dos consumidores, por outro lado é necessário estimular a inovação alimentar e a obtenção de elevadas produções, aos mais baixos custos. No entanto, conciliar estes princípios nem sempre é uma tarefa fácil (Wilhelmsen *et al.*, 1998).

Um alimento é considerado adulterado se qualquer componente valioso foi, em parte, ou na totalidade subtraído; se qualquer substância foi substituída, em parte ou na totalidade; se qualquer tipo de alteração ou falta de qualidade foi omitida; ou se qualquer substância foi adicionada em vez de, ou em mistura com, de forma a aumentar o seu volume ou peso, reduzir a sua qualidade ou força, ou fazê-lo parecer melhor ou de maior valor do que, de facto, é (Wilhelmsen *et al.*, 1998).

A responsabilidade qualitativa de um produto cabe, de uma maneira geral, a todos quantos participam na sua elaboração, tais como produtores e transformadores – não esquecendo que ninguém poderá obter um produto original, com elevada qualidade, partindo de matérias-primas medíocres – passando ainda por distribuidores e vendedores.

A primeira tentativa de garantir a qualidade e a genuinidade dos alimentos e dos seus ingredientes, e prevenir a especulação económica, foi a Via Legislativa. Com este objectivo, foram implementadas regras no que toca, nomeadamente, à Rotulagem (Ferreira, 1999).

A exigência de rotulagem pormenorizada dos componentes que podem pôr em causa a segurança dos alimentos é fundamental, quer por razões de saúde, económicas, religiosas, ou simplesmente, por uma questão de legalidade ou de regulamentação. Este princípio requer estratégias de controlo que garantam o cumprimento do mesmo (Faria e Ferreira, 1999).

Surge, em consequência destes aspectos, o conceito de autenticação alimentar, que se pode descrever como o processo pelo qual um alimento é verificado e comparado com a descrição que consta do seu rótulo (Dennis, 1998).

A legislação que regulamenta a rotulagem tem pois, como objectivo, garantir que um produto esteja descrito de forma correcta. Por um lado, isto protege o consumidor de comprar um produto inferior com uma falsa descrição e, por outro, protege os produtores honestos, de uma concorrência desleal (Dennis, 1998).

Assim, a autenticação dos produtos alimentares reveste-se de uma importância vital, tanto para consumidores, como para industriais, a todos os níveis do processo de produção, desde a matéria-prima até ao produto acabado. Do ponto de vista legislativo, as normas de qualidade estabeleceram-se através da exigência de rótulos que especifiquem a composição química de cada produto. Do ponto de vista económico, a autenticação de um produto é essencial para evitar a competição desleal que pode ocasionar um desequilíbrio no mercado e despedaçar a economia regional e mesmo a economia nacional (Cordella *et al.*, 2002).

A avaliação da qualidade de um alimento torna-se mais difícil, quanto mais complexo, elaborado ou processado for esse alimento.

Devido à grande variedade de queijos, com diferentes características microbiológicas e bioquímicas, sujeitos a diferentes processos de maturação, os marcadores de autenticidade químicos e biológicos que se têm identificado para um determinado tipo de queijo, não são aplicáveis a todos (Velooso *et al.*, 2002a).

Alguns dos queijos com DOP são fabricados com quantidades definidas de cada tipo de leite. Assim, a pesquisa de autenticidade nas análises destes queijos deve ser feita, não apenas no sentido de identificar as espécies de leite presentes, mas também de forma, a quantificar a percentagem de leite de vaca, ovelha e cabra, em queijos mistos (Ferreira e Caçote, 2003).

São diversas as metodologias que se podem utilizar para pesquisar, entre outras, as adulterações de leite de determinada espécie, com leites de outras origens.

### 1.5.1 - MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Encontram-se descritos na literatura, diversos trabalhos que recorrem à técnica de HPLC, com o intuito de pesquisar adulterações de leite de determinada espécie, com leites de outras origens. Em seguida, são referidos vários exemplos:

Urbanke *et al.* (1992) procederam à identificação de leite de vaca em leites e queijos de outras espécies usando uma metodologia por RP-HPLC. Esta técnica permitiu a detecção de 1% de leite de vaca em leite humano através da presença de  $\beta$ -lactoglobulina (variantes AB) e de  $\alpha$ -lactalbumina bovinas, na fracção do soro, e de  $\kappa$ -caseína, na fracção das caseínas. Assim como, a detecção da adulteração de leite de ovelha e de cabra, com leite de vaca, através da  $\beta$ -lactoglobulina. Quantidades de 2% de leite de vaca foram identificados em amostras de queijo *Pecorino* com 2 anos de maturação, com adulteração conhecida.

Kaminarides *et al.* (1993) conseguiram a separação das diferentes fracções de caseína de leite de vaca, ovelha e cabra, por HPLC por troca aniónica. Nas condições descritas neste método, obtiveram cromatogramas muito similares para os leites de ovelha e de cabra, mas bastante diferentes daquele que se obteve para o leite de vaca. Verificaram que a eluição da fracção  $\alpha_{S1}$  da caseína bovina ocorria mais tardiamente do que a da ovina ou caprina, para as mesmas condições cromatográficas. O que foi utilizado para detectar e quantificar a presença de leite de vaca, em leite de cabra ou de ovelha. A quantidade de leite de vaca adicionado pode ser calculada pela integração do pico da fracção  $\alpha_{S1}$  da caseína bovina, utilizando uma curva padrão, preparada previamente, com amostras adulteradas de concentração conhecida.

Torre *et al.* (1996) recorreram, igualmente, a um método de RP-HPLC, para a separação das principais proteínas do soro:  $\alpha$ -lactalbumina, albumina do soro e as 2 variantes genéticas da  $\beta$ -lactoglobulina (A e B). Este método permitiu a separação de proteínas homólogas do soro de leites de ovelha e de cabra e ainda, a identificação de proteínas homólogas em misturas de leites de várias espécies. Em misturas binárias foi possível detectar a presença de leite de ovelha, em leite de vaca e vice-versa, através de um dos dois picos de  $\alpha$ -lactalbumina e dos picos da  $\beta$ -lactoglobulina B do leite de ovelha e da  $\beta$ -lactoglobulina A do leite de vaca, respectivamente. A adição de leite de ovelha ao leite de cabra pôde ser detectada pelos picos da  $\beta$ -lactoglobulina B do leite de ovelha. No entanto, a adição de leite de cabra ao leite de ovelha não pôde ser detectada, por este método. Consegui-se detectar a adição de leite de vaca ao leite de cabra, através dos picos da  $\alpha$ -lactalbumina e da  $\beta$ -lactoglobulina A do leite de vaca. As quantidades mínimas detectadas, em misturas de diferentes espécies, foram calculadas em: 0,1 de leite de vaca em 1 de leite de ovelha, 0,1 de leite de ovelha, em 1 de leite de cabra e 9 de leite de vaca, em 1 de leite cabra. Estes valores estão expressos em massas de soro. Este método tem interesse, tanto para análises de rotina, como em controlo de qualidade de produtos lácteos e na pesquisa de adições fraudulentas de leites de diferentes espécies, no fabrico destes produtos.

Bramanti *et al.* (2004) utilizaram também a cromatografia de interacções hidrofóbicas, mas desta vez recorrendo a um detector de tensão superficial dinâmica (DSTD). Esta é medida pela diferença de pressão ao longo da interface líquido-ar nas repetidas gotas em formação e em separação. A medição, de forma contínua, da tensão

superficial ao longo de todo o crescimento da gota (50ms a 4s), fornece informação tanto sobre os processos cinéticos, como termodinâmicos, de orientação molecular na interface líquido-ar. Obtêm-se dados tridimensionais, em que a tensão superficial é função do tempo de formação da gota, que por sua vez é função do tempo de eluição cromatográfico. Esta metodologia foi otimizada, tendo sido aplicada com êxito na análise selectiva da fracção das caseínas com actividade superficial ( $\alpha_{s1}$ - e  $\beta$ -caseína), numa amostra comercial de caseínas, em várias amostras de leite cru (vaca, ovelha e cabra) e noutros tipos de produtos lácteos, tais como queijo e iogurte. Foi possível distinguir, rapidamente, as diferentes amostras, através da selectividade conseguida com esta metodologia. A utilização do DSTD permitiu identificar e determinar a concentração de proteínas com actividade superficial em matrizes complexas. No caso das proteínas de leite, em produtos lácteos, a análise da amostra em condições nativas, em que apenas as caseínas apresentam actividade superficial e em condições desnaturantes onde tanto as caseínas, como as proteínas do soro apresentam actividade superficial, permitiu fazer, de forma rápida, a medida quantitativa da razão caseína/proteínas do soro.

Veloso *et al.* (2002b) recorreram também ao HPLC, para separar e quantificar as principais fracções de caseína, de forma a detectar adulterações em leites. O método desenvolvido foi também utilizado para a separação de caseínas homólogas de leites de ovelha e de cabra, tendo-se observado boas separações das fracções das caseínas nos três tipos de leite, nas condições cromatográficas descritas. Esta técnica permitiu a detecção de leite de vaca em leite de cabra, em percentagens iguais ou superiores a 5% (v/v), baseando-se na fracção da  $\alpha$ -caseína de vaca. A quantidade de leite de vaca adicionado em amostras adulteradas pode ser calculada por integração da área do pico da  $\alpha$ -caseína de vaca, utilizando uma curva padrão preparada previamente com amostras adulteradas de composição conhecida. Contudo, esta técnica não permitiu detectar a adição de leite de vaca a leite de ovelha. Este método mostrou-se útil para a separação e quantificação por rotina de  $\kappa$ -,  $\alpha$ - e  $\beta$ -caseínas, tanto em leites crus, como processados, assim como, para detectar e quantificar adulterações de leites de cabra.

Os mesmos autores (2004) utilizaram também o HPLC para avaliar a proteólise das caseínas de queijos de pequenas dimensões feitos com leite de ovelha, vaca, ou misturas, assim como a autenticidade de queijos de ovelha com 30 dias de maturação. Os resultados obtidos mostraram que esta técnica permitiu avaliar a proteólise durante a

maturação em queijos 100% de ovelha, 10% vaca em ovelha, 20% vaca em ovelha e 100% de vaca, com 30 dias de maturação e fabricados de acordo com a técnica de produção de queijos tipo *Terrincho* (mas com cerca de 70 g e não de 1kg). Constatou-se que a  $\alpha$ -caseína foi a fracção que sofreu maior proteólise, durante este período, enquanto as outras fracções permaneceram quase inalteradas, tal como descrito anteriormente, para outros tipos de queijo. Esta técnica permitiu, ainda, detectar a presença de 20% de leite de vaca em leite de ovelha.

Ferreira e Caçote (2003) descrevem um método para detectar e quantificar misturas de leites bovino, ovino e caprino em leites e queijos, por RP-HPLC. Esta técnica baseia-se na relação linear que se verificou entre o  $\log_{10}$  das razões dos picos da  $\beta$ -lactoglobulina (calculada como razão dos valores das áreas dos picos) e o  $\log_{10}$  da percentagem relativa de leite bovino ou caprino. A razão entre os picos de  $\beta$ -lactoglobulina não foi afectada pelo grau de maturação dos queijos. Analisaram-se misturas binárias, com diferentes proporções, de leite de vaca e ovelha e de leite de vaca e cabra, assim como, de leite de ovelha e de cabra. Foram preparados e curados queijos, de acordo com as técnicas tradicionais. Utilizando as mesmas condições cromatográficas, obtiveram-se diferentes perfis para as proteínas do soro dos leites de vaca, ovelha e cabra. Com este trabalho, concluiu-se que a análise da  $\beta$ -lactoglobulina por HPLC é útil para a identificação de proteínas homólogas em misturas de leites de diferentes espécies. O método foi sensível e preciso para a determinação das percentagens de cada tipo de leite em queijos frescos e curados produzidos com misturas binárias de leites crus de vaca, ovelha ou cabra.

É de referir, contudo, que os métodos de quantificação dos leites das diferentes espécies que se baseiam na análise das proteínas do soro, sofrem uma limitação, na medida em que esta fracção é mais sensível ao calor que a fracção das caseínas, pelo que pode gerar falsos negativos quando se utilizam leites esterilizados para o fabrico de queijos (Amigo *et al.*, 1991). No entanto, como os queijos com DOP são produzidos a partir de leite cru, utilizando técnicas tradicionais, a análise das proteínas do soro, oferece a vantagem de que estas são menos susceptíveis à proteólise, do que as caseínas. Este método revelou-se útil para a pesquisa de adulterações em queijos com DOP, mesmo quando estes possuem, já, algum tempo de maturação.

### 1.5.2 - MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS

As técnicas electroforéticas têm sido, também, uma ferramenta útil na pesquisa de adulterações de leites de diferentes origens, com outros tipos de leite, tal como se pode verificar pelos exemplos a seguir mencionados:

Cartoni *et al.* (1999) utilizaram a electroforese capilar para a pesquisa de adulterações com leite de vaca, em produtos à base de leite de cabra. A quantidade mínima de leite de vaca detectada foi de 2% em misturas de leite e 4% em queijos. Neste trabalho, foram produzidos queijos de cabra, e queijos com 4, 15, 25, 40, 50, 60 e 80% de leite de vaca. Sete dias depois da produção, as amostras de queijo foram preparadas para a electroforese capilar. Nas condições experimentais, a  $\alpha$ -lactoglobulina da vaca apresentou o mesmo tempo de migração que uma das duas proteínas do soro do leite de cabra. Portanto, o electroferograma de uma mistura de leite de vaca e de cabra apresentou quatro picos, o primeiro dos quais relativo a uma proteína de cabra e o último à  $\beta$ -lactoglobulina A de vaca. Estas duas proteínas puderam, portanto, ser utilizadas como marcadores úteis para detectar a presença dos correspondentes tipos de leite.

Mayer *et al.* (1999) utilizaram um método de focagem isoeléctrica para a detecção de misturas de leites de vaca, ovelha e cabra em queijos. Usando misturas de leites e queijos *Camembert*, com diferentes graus de maturação como padrão, conseguiram efectuar a determinação quantitativa da percentagem de leite de vaca em queijos de mistura, através da focagem isoeléctrica, seguida da avaliação densitométrica das  $\gamma$ -caseínas. No entanto, como os leites de ovelha e cabra não podem ser distinguidos por este método, os três tipos de leite foram diferenciados utilizando, além da focagem isoeléctrica, a técnica de HPLC, para determinação da para- $\kappa$ -caseína. Uma vez que estas fracções não são substancialmente afectadas pelo grau de maturação, este método revelou-se útil para a determinação da percentagem de leite de vaca, ovelha ou cabra em queijos de mistura (Mayer, 2005).

O método de Referência da Comunidade Europeia (2001) para a detecção de leite de vaca e caseinato em queijos de leite de ovelha, de cabra ou de búfalo ou de

misturas de leites de ovelha, cabra e búfalo utiliza, também, a técnica de focagem isoeléctrica. A detecção de leite de vaca em queijos de leites de ovelha, cabra ou búfalo ou de misturas destes leites é feita através da presença de  $\gamma$ -caseínas. O limite de detecção é inferior a 0,5%. Este método permite a detecção sensível e específica de leite de vaca cru ou tratado termicamente, ou de caseinato em queijos frescos ou maturados feitos a partir de leite de ovelha, cabra ou búfalo, ou de misturas destes três leites. Esta técnica não permite a detecção de adulterações de leite ou queijo com concentrados de proteínas de soro de leite de vaca tratados termicamente.

Veloso *et al.* (2002b) utilizaram a electroforese em gel de ureia-poliacrilamida para separar e quantificar as principais fracções de caseína, assim como, para separar caseínas homólogas em leites de ovelha, cabra e vaca, de forma a detectar adulterações. A determinação quantitativa das proteínas foi feita através da integração da área das bandas determinadas pelo densitómetro. A análise de misturas binárias de leites de vaca/ovelha e de vaca/ cabra (1, 2, 5, 10 e 20%, v/v) por ureia-PAGE revelou que o perfil da  $\alpha$ -caseína de vaca era significativamente diferente das outras bandas de caseínas. Foi possível detectar adulterações de leite de vaca em leite de ovelha, numa percentagem igual ou superior a 5% (v/v). Este método permitiu também detectar adulterações de leite de vaca em leite de ovelha numa percentagem de 5%, baseando-se na presença da banda  $\alpha_{S1}$ -caseína de vaca, em misturas de leites de vaca e de cabra. Com esta técnica foi, ainda possível, detectar adulterações de 2% devido à presença de uma banda ligeira na região da  $\alpha_{S1}$ -caseína. Os resultados obtidos por HPLC, quando comparados com os obtidos por electroforese foram concordantes. No entanto, a electroforese revelou ser mais sensível para a detecção de adulterações de leites, enquanto o HPLC se mostrou mais útil quando se visavam resultados quantitativos.

Os mesmos autores (2004) recorreram também a esta técnica para detectar a presença de adulterações em queijos de ovelha de pequenas dimensões, fabricados de acordo com a tecnologia do *Terrincho*, ao longo da maturação. Foi possível detectar a adição de 10% e 20% de leite de vaca até 30 dias da maturação, baseando-se na presença da  $\alpha$ -caseína da vaca. Através do HPLC foi apenas possível detectar adulterações com 20% de leite de vaca. Conseguiu-se uma boa resolução das caseínas extraídas dos queijos em estudo. A banda da  $\alpha$ -caseína era ainda proeminente nos

queijos de vaca e ovelha, apesar de se observar uma degradação parcial da caseína depois de 5 dias de maturação.

### 1.5.3 - MÉTODOS IMUNOLÓGICOS

Estas técnicas exploram as reacções imunológicas, baseando-se na interacção entre um anticorpo e o correspondente antigénio, de forma a detectar a presença de determinada substância. Os antigénios são, na sua maioria proteínas, podendo também ser, peptídeos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, lípidos e um sem número de outras substâncias. Os anticorpos são imunoglobulinas, moléculas glicoproteicas que reagem especificamente com o antigénio que estimulou a sua produção e que possuem locais activos complementares das determinantes antigénicas. Quando o anticorpo e o respectivo antigénio são postos em contacto podem reagir especificamente entre si. A reacção antigénio-anticorpo pode ser diferenciada em duas fases: a primeira, relacionada com a união entre o local de combinação do anticorpo e as determinantes antigénicas, ou hapteno do antigénio e a segunda, que resulta numa reacção visível como, por exemplo, de precipitação ou aglutinação (Hefle, 1995).

As técnicas imunológicas podem agrupar-se nos seguintes tipos: de precipitação, de aglutinação, de fixação do complemento, de imunofluorescência (FIA), radioimunológicas (RIA) e imunoenzimáticas. As 3 primeiras técnicas imunológicas aproveitam a segunda fase da reacção antigénio-anticorpo, isto é, aquela que permite a sua visualização. As 3 últimas utilizam anticorpo ou antigénio conjugados com diferentes substâncias, tais como fluorcromos, isótopos radioactivos e enzimas.

Os anticorpos utilizados nas técnicas imunológicas são de dois tipos: policlonais ou monoclonais.

Dentro dos métodos imunológicos, as técnicas ELISA (ensaio de imunoabsorção com enzimas fixadas) são o método imunológico mais amplamente utilizado na análise de alimentos devido ao seu baixo custo, rapidez, facilidade de utilização e possível

automatização, permitindo a análise de um grande número de amostras, num curto espaço de tempo.

Estas técnicas baseiam-se na fixação do antigénio ou do anticorpo num suporte sólido e na visualização objectiva da interacção antigénio-anticorpo, mediante a conjugação de um dos componentes da reacção com uma enzima. Os métodos imunoenzimáticos permitem o desenho de diferentes metodologias, dos quais, os mais utilizados são: ELISA indirecto, *sandwich* e competitivo (Haza *et al.*, 1997).

García *et al.* (1991) desenvolveram um método de ELISA em *sandwich* para a detecção de quantidades definidas de leite de vaca, em leite de ovelha. Os anticorpos policlonais contra as proteínas do soro de leite de vaca, foram obtidos de coelhos. De forma a tornar o soro de coelho específico para as proteínas do soro do leite de vaca, aquele foi purificado por cromatografia de afinidade, de modo a remover os anticorpos capazes de uma reacção cruzada com as proteínas do soro dos leites de ovelha e de cabra. Os anticorpos anti proteínas do soro do leite de vaca foram conjugados com biotina. Uma vez que esta é uma molécula pequena, a sua ligação ao anticorpo em estudo, não tem os mesmos efeitos negativos que ligar directamente uma enzima ao anticorpo, além de que o produto final é muito mais estável que o conjugado enzima-anticorpo. Os anticorpos conjugados com biotina são depois detectados com avidina-peroxidase. Este método permitiu a detecção e quantificação de adições de leite cru de vaca, em percentagens de 1-30%. No entanto, não foi possível detectar a adição de leite de vaca esterilizado ou UHT. A resposta com o leite de vaca pasteurizado foi 50% mais baixa que a obtida com leite de vaca cru.

Rodríguez (1992) utilizando um ELISA indirecto e anticorpos policlonais contra a caseína total bovina, ovina e caprina, neutralizados ou purificados por cromatografia de afinidade, detectou e quantificou a presença de 1 a 50% de leite de vaca em leites de ovelha e cabra e a substituição de 1 a 25% de leite ou queijo de ovelha pelo de cabra. No mesmo trabalho, utilizando a técnica de ELISA em *sandwich*, foi capaz de detectar e quantificar de 0,1 a 25% de leite de vaca em leites e queijos de ovelha e cabra e de 1 a 100% de leite de cabra em leites e queijos de ovelha. Concluindo, ainda, que os tratamentos térmicos a que o leite comercial é submetido, não influenciam na detecção de leite de vaca e cabra pelo método de ELISA indirecto. Por outro lado, com o ELISA

em *sandwich* perde-se muita sensibilidade, ao aquecer o leite a temperaturas superiores a 70°C.

Como se pode verificar, pelos exemplos apontados, as primeiras tentativas para desenvolver imunoenaios, de forma a detectar adulterações com leite de vaca, focaram-se nas proteínas do leite, tais como a caseína e as proteínas do soro. Contudo, as proteínas do leite são propensas à proteólise, além disso, as caseínas são frequentemente pouco imunogénicas (Levieux e Venien, 1994). Por outro lado, e uma vez que há similaridade entre as sequências primárias das caseínas, muitos imunoenaios demonstraram pouca capacidade para distinguir entre leites de espécies próximas, tais como vaca e búfalo, ovelha e cabra (Bottero *et al.*, 2002).

Por este motivo, Hurley *et al.* (2004a, 2004b) desenvolveram uma técnica por ELISA competitivo, utilizando um anticorpo monoclonal anti-IgG bovina, de forma a detectar leite de vaca em leites de outras espécies. O anticorpo monoclonal anti-IgG bovina usado neste trabalho, mostrou ser tão sensível, quanto específico e de fácil obtenção. O limite de detecção de 1µg/ml de IgG bovino demonstra a elevada sensibilidade do ensaio, sem reacção cruzada significativa com as IgGs ovina, caprina ou de búfalo. O ensaio é igualmente sensível, quando testado com leites pasteurizados de vaca, leites não tratados e leites que tenham sido previamente congelados. Contudo, o ensaio é incapaz de detectar IgG bovina em leites UHT ou em leites em pó reconstituídos, pois o aquecimento requerido para a obtenção de tais produtos, leva à desnaturação do epítipo alvo. Com esta técnica foi possível detectar leite de vaca em leites de cabra, ovelha ou búfalo, com um limite de detecção, para todos os leites, de 0,1%. O método de ELISA descrito neste trabalho apresenta também a possibilidade de quantificar as adulterações com leite de vaca, o que constitui uma vantagem nos ensaios que se pretendem aplicar, por rotina, na análise de produtos lácteos.

#### 1.5.4 - MÉTODOS DE ANÁLISE DE DNA

A reacção em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*), também designada por PCR, baseia-se em determinados aspectos que caracterizam a replicação de DNA. A DNA polimerase utiliza cadeias simples de DNA, como molde, para a síntese de novas cadeias complementares. Estas cadeias simples de DNA podem ser produzidas pelo aquecimento das duplas hélices de DNA, a temperaturas próximas da ebulição da água. A DNA polimerase requer uma pequena secção de cadeia dupla de DNA para iniciar a síntese. Desta forma, o ponto para iniciar a síntese de DNA pode ser especificado através do fornecimento de um oligonucleótido – *primer* – que se liga ao DNA mãe, nesse ponto. Esta constitui uma grande vantagem do método de PCR: a DNA polimerase pode ser dirigida para a síntese de uma região específica de DNA (Lees, 2003).

Ambas as cadeias de DNA podem servir como moldes. Para a técnica de PCR, os *primers* são escolhidos para se ligarem à região de DNA que se deseja ampliar, assim, as novas cadeias de DNA sintetizadas, iniciam-se em cada *primer* e estendem-se, para além da posição do *primer*, na cadeia oposta. Consequentemente, são gerados novos sítios de ligação para os *primers*, em cada nova cadeia de DNA sintetizada. Os produtos da reacção são, novamente, aquecidos, para separar as cadeias de dupla hélice de DNA original e do sintetizado, que passa a estar, depois, disponível para futuros ciclos de hibridação, síntese de DNA e separação das duplas hélices. O resultado final do PCR é que no final de  $n$  ciclos, a reacção contém um valor teórico de  $2^n$  moléculas de dupla hélice de DNA, as quais são cópias da sequência de DNA contida entre os *primers*. Este é o segundo aspecto importante do PCR: tem como resultado a amplificação de uma determinada região de DNA (Lees, 2003).

A DNA polimerase (*Taq* polimerase) da bactéria *Thermus aquaticus*, apresenta uma temperatura óptima de 72°C, mantendo-se relativamente estável, até aos 94°C (Saiki *et al.*, 1988). Desta forma, a *Taq* polimerase pode ser adicionada apenas uma vez no início da reacção, permanecendo activa após um conjunto completo de ciclos de amplificação. Este facto, permitiu a automatização da técnica de PCR, através da

utilização dos chamados termocicladores. Estes são aparelhos que se podem programar em termos de tempo e de temperatura necessários para levar a cabo os ciclos de PCR. Uma reacção de PCR comporta, geralmente, 25 a 40 ciclos de desnaturação, hibridação e extensão. O tamanho e a presença dos fragmentos amplificados são, normalmente, verificados por electroforese em gele de poliacrilamida.

A elevada especificidade, sensibilidade e simplicidade da técnica de PCR, fazem com que esta seja uma das mais importantes metodologias a usar na determinação da autenticidade de alimentos (Faria e Ferreira, 1999). Embora os ácidos nucleicos presentes nos alimentos não possuam qualquer valor nutricional podem ser importantes na avaliação da autenticidade nutricional, uma vez que são característicos dos vários componentes biológicos existentes nos alimentos. Este aspecto tem tanto maior relevância, quanto mais processado e complexo for um alimento (Candrian e Meyer, 1995).

O DNA é uma molécula extremamente estável, conseguindo manter a sua integridade parcial abaixo dos 120°C. E embora a sua fragmentação seja inevitável durante o processamento dos alimentos, quando o tamanho médio dos fragmentos extraídos for superior ao do fragmento alvo, continua a manter-se a possibilidade de amplificação (Faria e Ferreira, 1999).

A posterior aplicação de métodos discriminantes, tais como sequenciação ou digestão com enzimas de restrição, às sequências dos fragmentos amplificados, permitem a diferenciação de espécies isoladamente, ou presentes nos alimentos.

Plath *et al.* (1997) desenvolveram um método de PCR e de restrição enzimática de DNA nuclear, de forma a diferenciar os genes da  $\beta$ -caseína de vaca, cabra e ovelha. Obtiveram dois fragmentos de 66 e 181 bp, após utilizarem a enzima de restrição Alu I, ou 87 e 160 pb, quando usaram a enzima Ava II. A adição de leite de vaca ao leite de cabra, foi detectada por uma banda adicional, correspondendo ao produto por hidrolisar do PCR de bovino (253 bp). Este método permitiu a análise, de uma forma rápida e sensível, de queijos feitos com mistura de leites de ovelha e de cabra, tendo-se detectado até 0,5% de leite de vaca no queijo. Esta técnica permitiu, ainda, a detecção de adulterações com leites de vaca, mesmo quando este tinha sido, previamente, submetido a um forte tratamento térmico.

Mendes *et al.* (1999) recorreram, também, a esta metodologia, para detectar a adulteração de leite e queijo de ovelha, com leite de vaca. Neste trabalho, conseguiu-se a extracção de DNA partindo, tanto de amostras de leite (cru, pasteurizado e em pó), como de diferentes tipos de queijos de vaca, ovelha e mistura. Depois de feita a amplificação do fragmento específico do gene da  $\beta$ -caseína, verificou-se que o fragmento amplificado a partir de DNA bovino (253 bp) apresentava um tamanho superior ao do ovino (247 bp), permitindo, deste modo, a detecção de fraudes no leite e queijo de ovelha, adulterados com leite de vaca.

Outras técnicas de PCR baseadas na utilização de *primers* dirigidos para sequências universais, recorrem ao gene mitocondrial que codifica o citocromo b (*Cytb*). Para diferenciar, posteriormente, os fragmentos amplificados, a técnica mais utilizada é a RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism) ou Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição. Esta técnica caracteriza-se por uma grande simplicidade, quando comparada com as dificuldades e exigências associadas à sequenciação. Dado que as enzimas de restrição cortam o DNA em zonas de sequência determinadas e, tendo em conta, o elevado número de enzimas de restrição disponíveis, combinações destas proporcionam, com mais facilidade, a obtenção de polimorfismos (Faria e Ferreira, 1999).

Esta metodologia apresenta a vantagem de qualquer espécie desconhecida poder ser amplificada através de *primers* universais. Contudo, na presença de misturas complexas de duas ou mais espécies, a interpretação dos resultados da RFLP pode ser difícil, devido à sobreposição das cópias da restrição que pode ocorrer. Por outro lado, a eficiência da restrição enzimática deve ser cuidadosamente verificada, uma vez que uma pequena porção de material amplificado que não seja digerido, pode ser vista como uma espécie contaminante, não sendo alvo da restrição enzimática (Bottero *et al.*, 2002; 2003).

Assim e como alternativa a este método, podem utilizar-se vários pares de *primers* específicos na mesma reacção, para a identificação simultânea de duas ou mais espécies. Através das chamadas reacções de PCR em *multiplex*, os componentes de misturas complexas podem ser detectados num único passo, desde que os fragmentos amplificados específicos apresentem diferentes tamanhos e possam ser facilmente separados por electroforese em gel de agarose (Bottero *et al.*, 2002; 2003).

No entanto, a técnica de PCR em *multiplex* permite, somente, a identificação de espécies cuja presença seja esperada no alimento. No que diz respeito aos produtos lácteos, a sua aplicação é vantajosa, uma vez que, geralmente, apenas estão envolvidas algumas espécies (vaca, ovelha, cabra, búfalo), sendo altamente improvável que outras espécies desconhecidas estejam presentes (Bottero *et al.*, 2002; 2003).

Bottero *et al.* (2002) descrevem um método, através do qual pretendiam identificar a presença de leites de vaca e búfalo em queijo. Estes autores desenvolveram uma técnica de PCR em *duplex*. Os *primers* foram concebidos com base na sequência que codifica o *Cytb* mitocondrial tendo dado origem a dois fragmentos amplificados: 289 bp para a vaca e 192 bp para o búfalo. Esta técnica possibilitou a identificação, simultânea, das duas espécies, tendo permitido detectar a presença de leite de vaca em queijos comercializados, em cujo rótulo constava 100% de leite de búfalo.

Bottero *et al.* (2003), desenvolveram uma técnica de PCR *multiplex* para a identificação simultânea de leites de vaca, ovelha e cabra, em produtos lácteos, com uma sensibilidade da ordem dos 0,5% para o leite de vaca. Este objectivo foi atingido depois de se terem desenhado *primers* específicos para as três espécies, a partir de sequências de genes de mtDNA. A utilização destes *primers* levou à formação de fragmentos de diferentes comprimentos: 256 bp para a vaca, 326 bp para a cabra e 172 bp para a ovelha. Esta técnica, rápida e simples, é aplicável em análises de rotina.

Mafra *et al.* (2004) desenvolveram uma técnica de PCR *duplex* para a detecção de leite de vaca cru, ou processado, em diferentes queijos de ovelha. Neste trabalho, correlacionaram-se as intensidades das bandas para a vaca e ovelha dos produtos do PCR pertencentes a queijos com quantidades definidas de leite de vaca, tendo-se obtido uma resposta linear entre o logaritmo da razão da intensidade da banda bovina e da soma das intensidades das bandas bovina e ovina, *versus* o logaritmo da percentagem de leite de vaca, tendo-se construído uma curva de calibração. Deste modo, foi possível a quantificação das adulterações de queijos de ovelha com leite de vaca. Este método foi aplicado com êxito na detecção e quantificação de leite de vaca cru, pasteurizado, ou em pó, em vários queijos, tendo permitido detectar até 0,1% de leite de vaca nos queijos e quantificar o leite de vaca em queijos de ovelha num intervalo de 1-50%.

## 1.6 – OBJECTIVOS

São numerosos os trabalhos no âmbito da caracterização e pesquisa de adulterações em produtos lácteos, nomeadamente, em queijos. Contudo, neste caso, dada a grande variedade de queijos com diferentes características bioquímicas e microbiológicas, associadas aos vários factores que podem afectar a sua maturação, os métodos aplicáveis a uns podem não ser aplicáveis a outros. É, por isso importante o desenvolvimento e a aplicação de metodologias que permitam um conhecimento mais aprofundado de cada variedade.

Num trabalho realizado anteriormente, Veloso (2001) desenvolveu uma metodologia por HPLC para separar e quantificar as diferentes fracções de caseínas do leite de vaca. Esta metodologia foi aplicada, posteriormente, ao estudo de queijos tipo *Terrincho* de muito reduzidas dimensões ( $69 \pm 9,7$  g). Contudo, os resultados obtidos embora indicassem que a metodologia de HPLC podia ser aplicada no estudo da proteólise e autenticidade deste tipo de queijo, não podiam ser extrapolados aos queijos de dimensões reais, atendendo à diversidade de factores que influenciam a proteólise do queijo *Terrincho*. Assim, na continuidade deste trabalho, e depois de feitos melhoramentos à técnica desenvolvida previamente, procurou-se estudar verdadeiros queijos *Terrincho* DOP, com o objectivo de acompanhar as alterações sofridas pelas diferentes fracções de caseína, ao longo da maturação, contribuindo assim para uma melhor caracterização deste produto. Do mesmo modo, com o objectivo de garantir a autenticidade deste queijo regional, acompanhou-se a proteólise de queijos de leite de vaca e de mistura de leite de vaca e de ovelha, preparados nas mesmas condições e segundo a mesma técnica. A proporção escolhida de leite de vaca, nos queijos de mistura, foi de 10% e 20%. Estes valores foram usados uma vez que, quantidades de adulteração com leite de vaca inferiores a 10% não são rentáveis para os produtores, embora constituam um delito não justificando, por isso, os riscos corridos. Por outro lado, o consumidor detecta facilmente adulterações de queijo *Terrincho* com leite de

vaca em quantidades superiores a 20%, uma vez que o produto final apresenta características organolépticas muito diferentes do primeiro.

Uma vez que as características sensoriais de um queijo são a característica que o consumidor avalia em primeiro lugar, procurou-se correlacionar os parâmetros químicos analisados anteriormente, com as características sensoriais do queijo *Terrincho*, de vaca e de mistura.

Deste modo, estabeleceram-se como objectivos desta dissertação:

- Conhecer a evolução do processo proteolítico do queijo DOP *Terrincho*, ao longo dos 30 dias de maturação, através do estudo do perfil cromatográfico das proteínas da fracção insolúvel a pH 4,3, para aprofundar os conhecimentos sobre o processo bioquímico da proteólise deste queijo. Assim como, estabelecer uma regressão linear múltipla para prever se o queijo tem o tempo de maturação mínimo (30 dias) para ser colocado à venda.

- Avaliar a influência da origem do leite na proteólise do queijo, por comparação dos perfis cromatográficos e electroforéticos, de queijo *Terrincho*, de vaca e de mistura.

- Utilizar a Análise Quimiométrica dos resultados de HPLC para identificar os constituintes da fracção insolúvel a pH 4,3, que permitem avaliar a autenticidade do queijo *Terrincho* e estabelecer uma função com a qual se possam classificar as amostras de queijo, de acordo com a origem do leite.

- Correlacionar a composição da fracção insolúvel a pH 4,3, aos 30 dias de maturação, com as características sensoriais dos queijos *Terrincho*, de vaca e de mistura.

## *Capítulo 2*

## **CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 – AMOSTRAGEM**

As amostras de queijos analisadas foram manufacturadas numa queijaria certificada para a produção de Queijo DOP *Terrincho*.

Seguindo o procedimento normal de fabrico de queijo *Terrincho*, foi preparado um lote de queijos com leite de ovelha proveniente da raça *Churra da Terra Quente*. Utilizando exactamente o mesmo procedimento, foram preparados queijos com 100% de leite de vaca e com mistura de leite de vaca (10% e 20%) em leite de ovelha.

A preparação destes queijos decorreu da seguinte forma: os leites crus estremes ou em mistura usados na manufactura dos diferentes queijos foram previamente filtrados, tendo sido, posteriormente, aquecidos a 35°C e coagulados por adição de coalho de origem animal. A coalhada foi trabalhada até ficar do tamanho de grãos de arroz. Posteriormente, foi colocada em moldes, após compressão para facilitar a sinerese do soro. Os moldes foram prensados para permitir a remoção do soro remanescente. Os queijos obtidos, uma vez retirados dos moldes, foram imersos em salmoura e colocados em câmaras de maturação, com uma temperatura de 10-12°C e uma humidade relativa de 88-89%. Durante o período de maturação, os queijos foram virados e lavados de forma a que a crosta ficasse sempre seca e limpa, tendo sido, posteriormente, transportados para o laboratório sob refrigeração.

A colheita das amostras foi realizada, de acordo com os procedimentos estabelecidos na NP (EN ISO 707 2002).

Escolheu-se uma amostra aleatória de 32 queijos, para seguir a evolução da proteólise ao longo da maturação (7, 14, 21 e 30 dias). Em cada tempo de maturação foram seleccionados dois queijos de cada tipo (designados A e B).

Cada queijo foi dividido em 4 partes iguais, tendo sido numeradas como troços 1, 2, 3 e 4. Destes troços retirou-se uma fatia. Para cada queijo, foram analisados 2 troços diferentes, em duplicado. Os dois troços restantes foram congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para eventuais repetições, em caso de necessidade.

O peso médio e volume dos queijos variou entre 1,15 kg e 992  $\text{cm}^3$  até 0,9899 kg e 720  $\text{cm}^3$  do início ao fim dos 30 dias de maturação.

Para a análise sensorial utilizaram-se queijos *Terrincho* DOP e de vaca, com 30 dias de maturação.

O plano de amostragem encontra-se esquematizados na Figura 5.

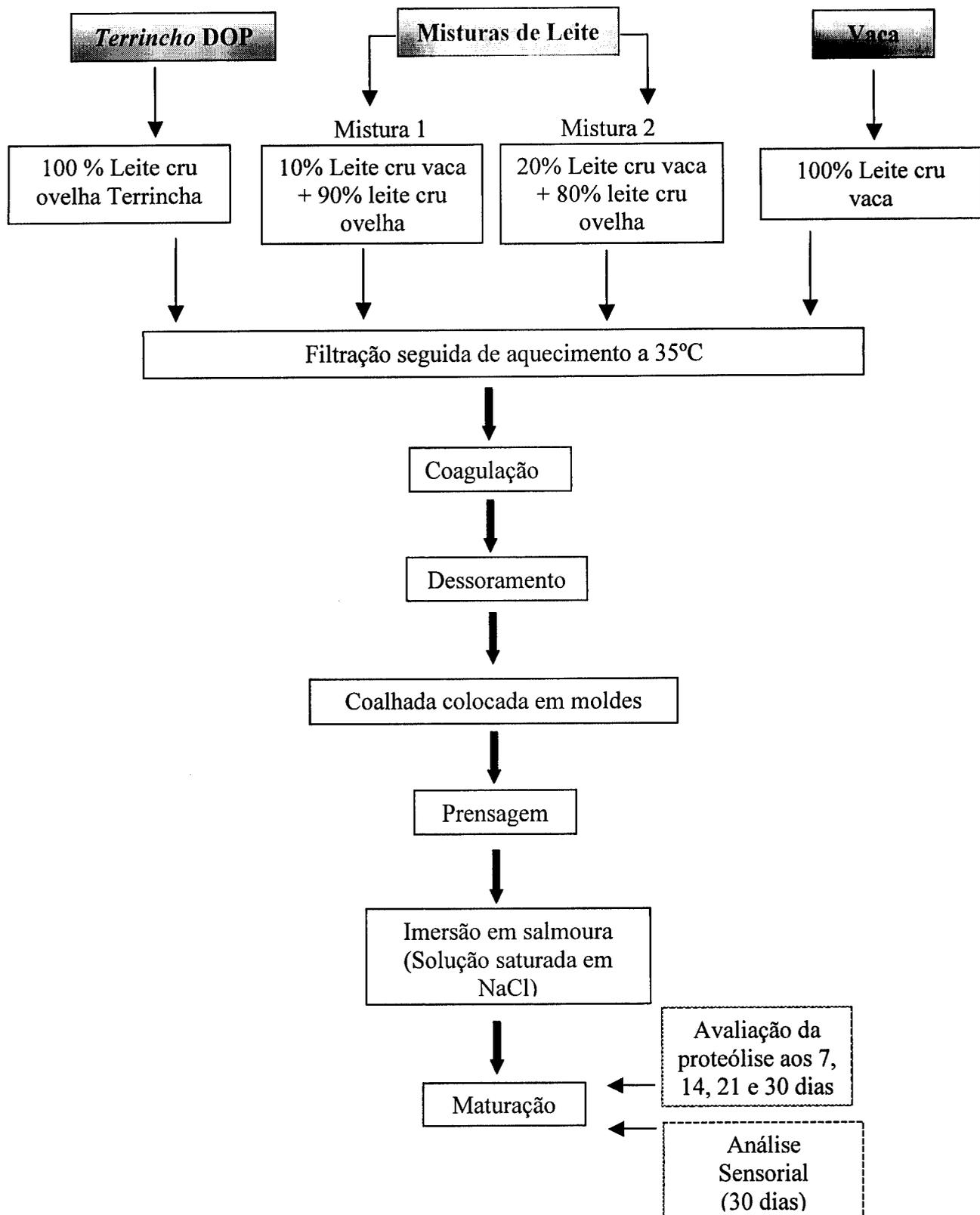


Figura 5 – Plano de amostragem.

## **2.2 – DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HUMIDADE E pH DOS QUEIJOS**

O teor de humidade dos queijos foi determinado, partindo de 5 g de amostra, depois de feita a homogeneização destas, utilizando-se um analisador de humidade electrónico (balança de humidade) da marca Scaltec.

O pH de cada amostra foi medido à temperatura ambiente, depois de feita a sua homogeneização. Para esta medição, utilizou-se um eléctrodo combinado de vidro, conectado a um medidor de pH MicropH 2001 Crisson.

## **2.3 - PREPARAÇÃO DA AMOSTRA**

### **2.3.1 - EXTRACÇÃO DA CASEÍNAS**

Adoptou-se o método de extracção das caseínas, a seguir indicado, depois de otimizar e validar a técnica extractiva, de forma a obter o máximo rendimento da extracção:

- i) As amostras foram cortadas em forma de cunha, a casca foi retirada e o queijo homogeneizado;
- ii) Foram pesados 2,5 g do queijo homogeneizado;
- iii) Foram adicionados 15 ml de água destilada a 8°C, tendo-se feito a homogeneização no ultra-turrax, seguida de uma centrifugação a 3000 g, durante 10 minutos. Em seguida, retirou-se cuidadosamente a gordura que se encontrava à superfície, tendo-se rejeitado o líquido sobrenadante.

Esta operação foi novamente repetida, não rejeitando desta vez o líquido sobrenadante;

- iv) Procedeu-se a uma nova homogeneização no ultra-turrax;
- v) Foi feita a medição de pH e adicionado HCl 0,1M até se atingir um pH de 4,3. Nesta determinação foi utilizado um eléctrodo combinado de vidro para determinação de pH, da marca Hanna Instruments.
- vi) A suspensão foi centrifugada a 4°C durante 15 minutos a 3000 g, de forma a recuperar as caseínas precipitadas;
- vii) O precipitado foi lavado várias vezes com acetona e filtrado por papel de filtro;
- viii) O filtrado obtido foi seco, pesado e guardado em excicador.

### 2.3.2 - DISSOLUÇÃO DA AMOSTRA

De acordo com o método desenvolvido por Veloso (2001) a linearidade desta técnica, para a determinação da caseína total, situa-se entre 0,377-3,765 mg/ml.

As caseínas em pó foram, assim, homogeneizadas em almofariz, tendo-se pesado 4 mg que foram dissolvidos em 2 ml numa mistura contendo 70% de uma solução 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) em água (v/v) e 30% de uma solução de 80% de acetonitrilo, 20% de água e 0,1% de TFA (v/v). As soluções foram agitadas, de forma vigorosa, e colocadas num banho de ultra-sons, até dissolução total.

## 2.4 – HPLC / UV NA ANÁLISE DAS CASEÍNAS

### 2.4.1 – PADRÕES E REAGENTES

Foram utilizados padrões das frações  $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\kappa$ -caseínas bovinas e de caseína total bovina. Estes foram fornecidos pela firma Sigma Chemicals Co., com a indicação dos respectivos graus de pureza: 85% para o padrão da  $\alpha$ -caseína bovina, 90% para o padrão da  $\beta$ -caseína bovina, 80% para o padrão da  $\kappa$ -caseína bovina. Contudo, esta informação estava omissa, no caso do padrão da caseína total bovina, tendo este valor sido determinado pelo método de *Bradford* (Bradford, 1976), obtendo-se o valor de 75% de pureza.

As concentrações referentes às soluções dos diferentes padrões foram calculadas, tendo em conta os seus respectivos graus de pureza.

Os solventes utilizados possuíam qualidade analítica, tendo o acetonitrilo sido fornecido pela firma Merck, com uma pureza mínima de 99%. O ácido trifluoracético apresentava uma pureza mínima de 99%, tendo sido adquirido na firma Fluka.

A água usada era ultra-pura, sendo a sua purificação efectuada num sistema Seral (Serapur Pro 90 CN).

Antes de serem utilizados, os solventes foram filtrados por uma membrana Schleider & Schull, com uma porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$ , N17, sendo posteriormente, desgasificados sob vácuo, durante 10 minutos.

O banho de ultra-sons utilizado na desgasificação dos eluentes e preparação de amostras era da marca Bandelin Sonorex RK 100.

### 2.4.2 – EQUIPAMENTO

As análises foram efectuadas num cromatógrafo de marca Jasco, o qual se encontrava equipado com uma bomba quaternária da baixa pressão Jasco PU-1580 Intelligent HPLC pump, acoplada a um módulo de desgasificação Jasco DG-1580-54 4-line degasser, um injector Rheodyne, modelo 7125, possuindo um loop com uma capacidade de 20  $\mu$ l. A detecção realizou-se, utilizando um detector UV/ VIS Jasco UV-970 intelligent UV/VIS detector. Os dados foram recolhidos e tratados, com recurso ao software Jasco-Borwin versão 1.50 para Windows.

A separação cromatográfica realizou-se numa coluna *Chromopack P 300 RP*, constituída por um polímero de poliestireno divinilbenzeno, com um tamanho de partículas de 8  $\mu$ m, poro de 300 Å e d.i. de 150x4,6 mm. Foi utilizada uma pré-coluna *Chromopack P RP*, com o mesmo enchimento da coluna cromatográfica e um d.i. de 24x4,6 mm. A coluna cromatográfica foi aquecida, usando um forno de marca Jones Chromatography, de modelo 7981.

Na desgasificação dos eluentes e preparação das amostras utilizou-se um banho de ultra-sons da marca Bandelin Sonorex RK 100.

### 2.4.3 - CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

A separação das diferentes fracções das caseínas efectuou-se, depois de se ter feito a injeção, em duplicado, de 20  $\mu$ l de amostra. A eluição foi realizada a um fluxo constante de 1 ml/min, à temperatura de 46  $\pm$  0,1°C. Utilizou-se uma eluição por gradiente, usando uma mistura de dois solventes. O solvente A consistiu em 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) em água e o solvente B continha acetonitrilo-água-TFA (95:5:0,1; v/v). O gradiente utilizado foi o seguinte: 29% de B durante 5 min, 29% a 37% de B em 5 min, 37% a 54% de B em 15 min, mantendo com 54%

de B durante 2 min, seguido de novo gradiente de 54% a 100% de B em 3 min, retornando às condições iniciais de 29% de B em 5 min.

A detecção foi feita a 280 nm.

#### 2.4.4 – IDENTIFICAÇÃO DAS CASEÍNAS

Como não foi possível utilizar padrão de caseína inteira de ovelha, nem das respectivas fracções, a identificação das fracções  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseínas foi feita com base:

- na comparação com os tempos de retenção dos padrões das fracções  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseínas do leite de vaca;
- pelo método da adição de padrão com caseínas de vaca

#### 2.4.5 - QUANTIFICAÇÃO DAS CASEÍNAS E AVALIAÇÃO DOS LIMITES DE DETECÇÃO

Obtiveram-se curvas de calibração para a caseína bovina total e para cada uma das fracções, utilizando 4 soluções padrão de diferentes concentrações, como se indica na Tabela 5. Cada solução padrão foi injectada em triplicado.

Tabela 5 – Concentrações dos padrões utilizados na quantificação das caseínas

Caseína	Intervalo de concentrações com resposta linear <sup>1</sup> (mg/ml)	Padrão 1 (mg/ml)	Padrão 2 (mg/ml)	Padrão 3 (mg/ml)	Padrão 4 (mg/ml)
Caseína bovina total	0,377-3,765	0,3563	0,7313	1,4813	3,7500
$\alpha$ - caseína	0,188-1,883	0,1913	0,4038	0,7438	1,934
$\beta$ - caseína	0,151-1,506	0,1575	0,3150	0,6075	1,5075
$\kappa$ - caseína	0,038-0,377	0,0400	0,080	0,1600	0,3770

<sup>1</sup>-Segundo o método desenvolvido por Veloso (2001).

O limite de detecção define-se como a quantidade mínima de composto a analisar que é possível detectar e que apresenta uma resposta significativamente diferente da de um ensaio em branco (Miller, 1991; Huber, 1998). Este foi avaliado como a concentração correspondente a três vezes o desvio padrão do ruído de fundo, após efectuar seis injeções sucessivas de solvente (70% de solvente A + 30% de solvente B).

#### 2.4.6 – ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO

De forma a avaliar a eficácia do método de precipitação e extracção das caseínas e de preparação da amostra, procedeu-se a ensaios de recuperação. Para o efeito, partiu-se de três alíquotas da mesma amostra de queijo *Terrincho* DOP, às quais se adicionou uma quantidade determinada de padrão de caseína inteira (73,42 mg; 137,20 mg e 375,00 mg). Depois da adição do padrão, aplicou-se o método de extracção, tendo-se pesado a caseína obtida. Por outro lado, utilizando o mesmo

método, extraiu-se a caseína de uma quarta alíquota da mesma amostra de queijo, tendo aquela sido utilizada como branco.

Os precipitados obtidos foram, posteriormente, analisados em triplicado, seguindo a técnica de HPLC descrita, depois de se ter procedido à sua dissolução, conforme o ponto 2.3.2. A percentagem de recuperação foi calculada, por comparação do teor de caseína obtida, nos diferentes ensaios, com e sem adição de padrão.

## 2.5 – ANÁLISE DAS CASEÍNAS POR UREIA-PAGE

As amostras de caseína foram analisadas por electroforese em gele de poliacrilamida no Instituto Politécnico de Bragança, de acordo com o método de Andrews (1983), com algumas modificações. O ensaio foi conduzido numa tina vertical modelo Mighty (SE 250/260 Amersham Pharmacia Bioetc), com uma fonte de voltagem EPS 301 (Amersham Pharmacia Bioetc).

Os géis eram constituídos por um gel de concentração a 4% e um gel de corrida a 10% de poliacrilamida. O tampão do gel de concentração foi uma solução de Tris 0,06 M e ureia 4,5 M, com pH 7,6. O tampão do gel de corrida foi uma solução de Tris 0,76 M e ureia 9 M, com pH 8,9. Para o tampão dos eléctrodos foi utilizada uma solução de Tris 0,02 M e glicina 0,19 M. A electroforese desenvolveu-se a 4° C, durante cerca de 2 horas e meia, a 20 mA até atingir o gel de corrida e posteriormente a 30 mA. Os géis foram corados com azul brilhante de Coomassie R250.

## 2.6 – ANÁLISE SENSORIAL DOS QUEIJOS

Efectuou-se a análise sensorial do queijo *Terrincho* DOP (T), dos queijos de mistura (M1 e M2) e do queijo de vaca (V). Os queijos analisados tinham 30 dias de maturação, tendo sido mantidos inteiros entre 3-4°C no laboratório, durante 3-4 dias, até à realização da análise sensorial. As amostras de queijo foram preparadas segundo o método descrito por Bárcenas *et al.* (2001).

As amostras foram analisadas por um júri constituído por 20 elementos, tendo estes sido previamente escolhidos e treinados na caracterização sensorial de queijos de leite de ovelha (Bárcenas *et al.*, 2000).

Para a quantificação da intensidade dos atributos considerados, foi escolhida uma escala de intervalos estruturados, na qual a sete categorias numéricas se fizeram corresponder palavras (frases), colocadas de forma ascendente de intensidade do atributo específico.

Foram avaliados atributos que pudessem estar de alguma forma relacionados com a proteólise (degradação da caseína). Os atributos foram a cor, a quantidade de orifícios, a intensidade do odor, a qualidade do odor, a intensidade do aroma, a qualidade do aroma, o cheiro a animal, a acidez, o ranço, o salgado, a adstringência, a elasticidade, a fracturabilidade, a adesividade e a dureza. Os parâmetros de textura foram avaliados ao comprimir o queijo com os dedos (elasticidade) e ao cortar com a faca (restantes parâmetros). A ficha usada na avaliação sensorial dos queijos está esquematizada na Figura 6.

**ANÁLISE SENSORIAL DO QUEIJO**

**Fase visual**

Cor amarela          menos intensa                 mais intensa

Orifícios                  menos                 mais

**Fase olfactiva**

Intensidade do odor          menor                 maior

Qualidade do odor          menor                 maior

**Avaliação da textura**

Elasticidade                  menor                 maior

Fracturabilidade          menor                 maior

Adesividade                  menor                 maior

Dureza                          menor                 maior

**Após degustação**

Intensidade do aroma          menor                 maior

Qualidade do aroma          menor                 maior

Aroma a animal                  menor                 maior

Ranço                          menor                 maior

Acidez                          menor                 maior

Salgado                          menor                 maior

Adstringência                  menor                 maior

Figura 6 – Modelo de ficha usado pelo provadores na análise sensorial dos queijos.

## 2.7 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

A exploração dos dados, análise descritiva, *teste t*, ANOVA com teste de Tukey, análise discriminante e regressão linear múltipla pelo método *stepwise* foram realizadas com o programa SPSS para Windows, versão 13.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

## *Capítulo 3*

## **CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 - PRECIPITAÇÃO DAS CASEÍNAS**

O ponto isoelétrico das caseínas situa-se entre 3,9 e 5,2 (Mulvihill e Fox, 1989). No entanto, os valores de pH geralmente referidos na literatura são 4,3 e 4,6, sendo o primeiro mais utilizado para precipitação das caseínas em leite e queijo de ovelha (Mayer e Hörtner, 1995), o que justificou a escolha deste valor de pH.

Nos queijos *Terrincho*, de vaca e de mistura 1 e 2 utilizou-se, antes da precipitação, água destilada a 8°C para dispersar as amostras, tendo em conta que temperaturas baixas promovem uma separação mais fácil da gordura do queijo. Não se utilizou uma temperatura inferior porque, de acordo com a literatura se a temperatura de refrigeração for demasiado baixa, podem produzir-se alterações das micelas de caseína e nalguns casos a desnaturação irreversível da  $\beta$ -lactoglobulina, podendo ocorrer a precipitação desta, conjuntamente com a caseína (Cayot e Lorient, 1997).

O peso de caseína obtido, após extração de uma toma de amostra pesada rigorosamente, foi usado para determinar o total de caseína nas amostras, expresso em g de caseína por 100 g de toma.

### 3.2 – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE EM FASE REVERSA PARA SEPARAÇÃO DAS CASEÍNAS

#### 3.2.1 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS FRACÇÕES DE CASEÍNA

Efectuou-se a optimização das condições cromatográficas para a separação das fracções  $\kappa$ ,  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$  e  $\beta_1$  caseínas bovinas, com o intuito de conseguir uma boa resolução dos picos (Figura 7).

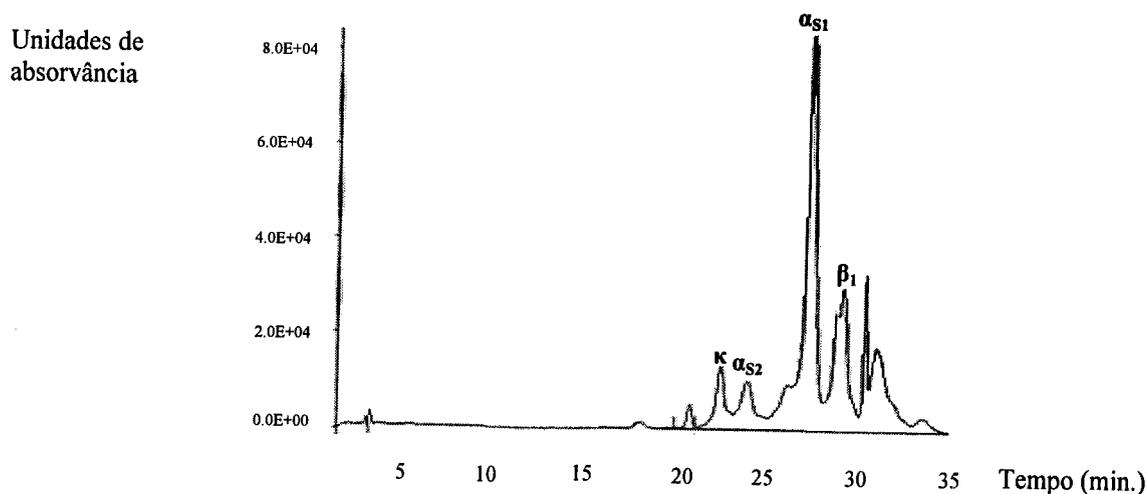


Figura 7 – Separação cromatográfica das fracções  $\kappa$ ,  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$  e  $\beta_1$  de caseínas bovinas.

A identificação dos picos realizou-se pelo método de adição de padrão de fracções de caseína bovina e por comparação com os resultados obtidos por outros autores, utilizando condições cromatográficas semelhantes (Visser *et al.*, 1986).

No cromatograma após 30 minutos, observou-se o aparecimento de dois picos finais com um tempo de eluição da ordem dos 31 minutos, que pode ser atribuído ao

rápido retorno das condições do eluente às condições iniciais e, provavelmente, à eluição de pequenas quantidades de TFA adsorvidas pelo material da coluna ao longo do gradiente e eluídas ao regressar às condições iniciais. Este facto foi constatado por Veloso (2001) quando procedia ao desenvolvimento desta metodologia, mas já havia sido anteriormente referido por Elgar *et al.* (2000), quando estes efectuaram o estudo das proteínas do soro de leite de vaca por HPLC em fase reversa, com uma coluna de poliestireno divinilbenzeno.

### 3.2.2 – LINEARIDADE, CURVAS DE CALIBRAÇÃO E LIMITES DE DETECÇÃO

Nas condições experimentais descritas, verifica-se uma relação linear entre as áreas dos picos referentes a cada fracção de caseína e a concentração. Observa-se idêntico comportamento para a caseína total.

Os parâmetros das curvas de calibração apresentam-se na Figura 8.

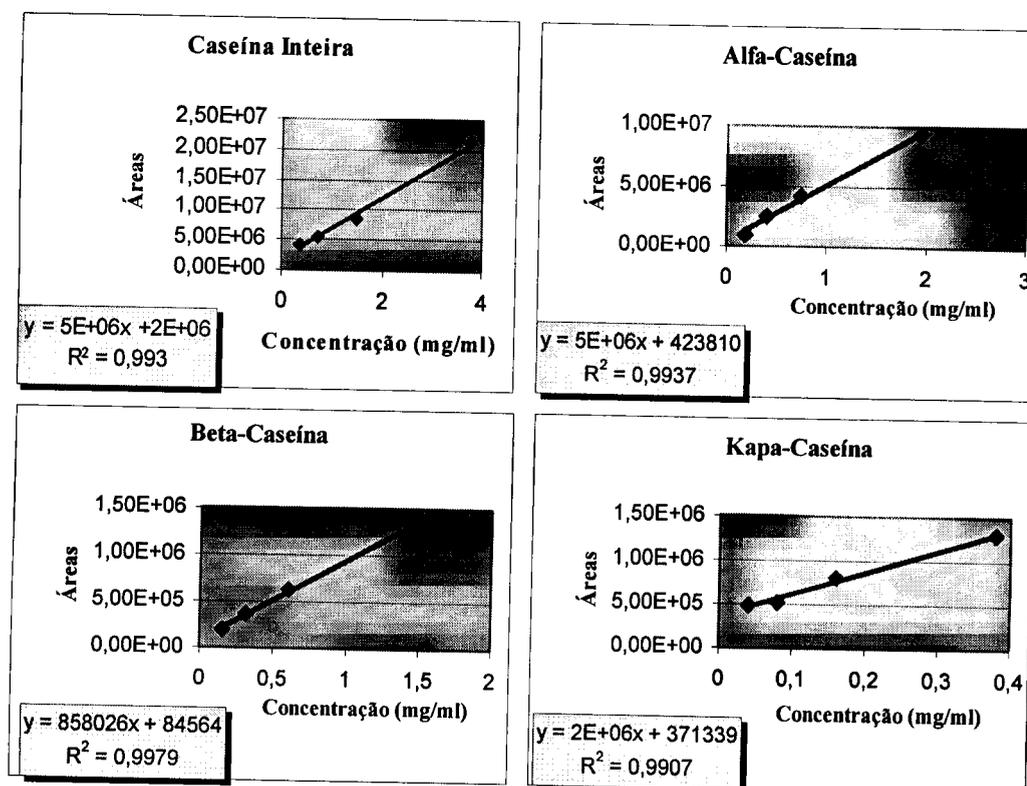


Figura. 8 – Curvas de calibração obtidas para a caseína inteira,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseínas

O limite de detecção da técnica foi de 0,0188 mg/ml para a  $\alpha$ -caseína e de 0,0150 mg/ml para a  $\beta$ -caseína (obtidos a partir da injeção de uma solução padrão de caseína inteira com a concentração de 0,0375 mg/ml) e 0,0060 mg/ml para a  $\kappa$ -caseína (determinado a partir da injeção de uma solução padrão de caseína inteira de concentração 0,060 mg/ml).

### 3.2.3 – QUANTIFICAÇÃO DAS CASEÍNAS E ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO

As caseínas nos ensaios de recuperação foram quantificadas, recorrendo às curvas de calibração obtidas para a caseína inteira e para cada uma das fracções.

Os resultados obtidos nos ensaios de recuperação apresentam-se na Tabela 6. É possível verificar que a técnica de extração apresenta elevadas percentagens de recuperação, entre 91 e 95% em relação à caseína total, o que demonstra a sua eficácia.

Convém referir que, uma vez que o padrão adicionado nestes ensaios foi o da caseína inteira bovina, a massa de cada fracção adicionada foi determinada com base na relação teórica conhecida e descrita na literatura: 10:50:40 (Bobe *et al.* 1998). Por outro lado, os valores correspondentes às massas de  $\kappa$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ -caseínas indicados, foram calculados utilizando as respectivas curvas de calibração.

Tabela 6 – Resultados dos ensaios de recuperação

Caseínas	<u>Valor inicial</u>		Valor adicionado mg/ 2g queijo	<u>Valor encontrado</u>		Recuperação (%)
	mg/ 2g queijo	CV(%)		mg/ 2g queijo	CV(%)	
Caseína total	364,62	0,99	375,00	669,66	2,50	91
$\kappa$ – caseína	24,72	0,56	37,50	57,41	1,65	92
$\alpha$ – caseína	192,82	1,33	187,50	339,88	2,37	89
$\beta$ – caseína	148,32	3,90	150,00	275,58	1,99	92
Caseína total	364,62	0,99	137,20	481,75	1,89	96
$\kappa$ – caseína	24,72	0,56	13,72	36,13	1,20	94
$\alpha$ – caseína	192,82	1,33	68,60	245,73	2,75	94
$\beta$ – caseína	148,32	3,90	54,88	193,04	1,73	95
Caseína total	364,62	0,99	73,42	416,14	1,30	95
$\kappa$ – caseína	24,72	0,56	7,34	31,09	2,37	97
$\alpha$ – caseína	192,82	1,33	36,71	220,35	2,10	96
$\beta$ – caseína	148,32	3,90	29,37	174,14	1,53	98

### 3.2.4 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS FRACÇÕES DE CASEÍNA DO QUEIJO *TERRINCHO* E ESTUDO DA EVOLUÇÃO DA PROTEÓLISE

As condições cromatográficas descritas foram utilizadas na separação das caseínas do queijo *Terrincho* (Figura 9), tendo-se obtido um perfil cromatográfico diferente do obtido para as caseínas bovinas. Este facto era de esperar, atendendo à diferente proporção das fracções de caseína, no leite de cada espécie.

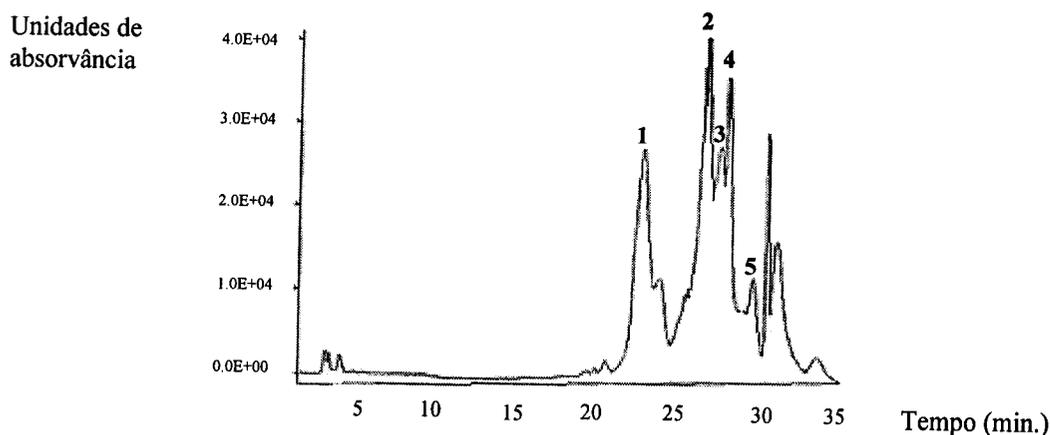


Figura 9 – Perfil cromatográfico das fracções de caseína do queijo *Terrincho*, numeradas por ordem de eluição em picos: 1 ( $\kappa$ -caseína), 2 ( $\alpha_{s2}$ -caseína), 3 ( $\beta_2$ -caseína), 4 ( $\alpha_{s1}$ -caseína) e 5 ( $\beta_1$ -caseína)

Contudo, os cromatogramas obtidos foram semelhantes aos obtidos por outros autores (Visser *et al.*, 1986). Os picos cromatográficos foram numerados de 1 a 5 por ordem de eluição, tendo-se identificado os diferentes picos nas caseínas ovinas por analogia com o leite de vaca e de acordo com os dados da literatura (Trujillo *et al.*, 2000, Veloso *et al.*, 2002b, 2004).

O pico 1 diz respeito às fracções da  $\kappa$ -caseína, pois elui com uma concentração de acetonitrilo de cerca de 38%, valor semelhante ao verificado por Trujillo *et al.* (2000) para a  $\kappa$ -caseína de ovelha de raça *Manchego*.

Os picos 2 e 4 dizem respeito à fracção da  $\alpha$ -caseína, respectivamente,  $\alpha_{S2}$  e  $\alpha_{S1}$ , atendendo a que a fracção  $\alpha_{S1}$  elui com maior quantidade de acetonitrilo (Trujillo *et al.*, 2000).

Os picos 3 e 5 dizem respeito à  $\beta_2$ -caseína e à  $\beta_1$ -caseína, que apresenta características mais apolares. A  $\beta_2$ -caseína não aparecia no leite de bovino, porque este não contém esta fracção de  $\beta$ -caseína. A  $\beta_1$ -caseína (pico 5) elui com tempo de retenção semelhante no cromatograma das caseínas de ovelha e de vaca, mas está em menor proporção no leite de ovelha, o que é concordante com os dados da literatura (Assenat, 1985)

Posteriormente, procedeu-se ao estudo da proteólise das caseínas do queijo *Terrincho*, ao longo da maturação. Verificou-se o aparecimento de alguns picos cromatográficos resultantes da degradação das caseínas, sendo de destacar o peptídeo  $\alpha_{S1-I}$ .

As áreas dos picos de  $\kappa$ ,  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_2$  caseínas e do peptídeo  $\alpha_{S1-I}$  obtidas, ao longo da maturação, foram normalizadas em função da quantidade de caseína extraída em 2,5 g de toma. Deste modo, foi possível avaliar a degradação verificada nas diferentes fracções de caseína ao longo da maturação do queijo, através do perfil cromatográfico obtido para a fracção insolúvel a pH 4,3. Utilizaram-se as áreas de cada uma das fracções de caseína identificadas, (picos 1, 2, 3, 4 e 5), bem como do peptídeo  $\alpha_{S1-I}$  (pico 2a).

Tal como se pode verificar na Figura 10, o perfil cromatográfico das caseínas do queijo *Terrincho* sofreu alterações entre os 7 e os 30 dias de maturação, especialmente, nos picos 2 e 4. A fracção de  $\alpha$ -caseína foi a que sofreu maior degradação durante a maturação do queijo *Terrincho*, o que está concordante com a literatura (Grappin *et al.*, 1985). As fracções de  $\kappa$  e  $\beta$  caseína também sofreram proteólise ao longo da maturação, embora não aparente ser tão significativa, principalmente a  $\beta$ -caseína que é bastante resistente à hidrólise.

No que respeita aos picos que surgiram no decorrer da maturação é de realçar o pico que se designa por 2a, com tempo de retenção próximo das  $\alpha$ -caseínas. Tudo indica que este pico se deve à formação do peptídeo  $\alpha_{S1-I}$  que resulta da acção da quimosina, tal como descrevem vários autores (Christense *et al.*, 1989; Irigoyen *et al.*, 2000).

Unidades de  
absorvância

Tempo de  
maturação

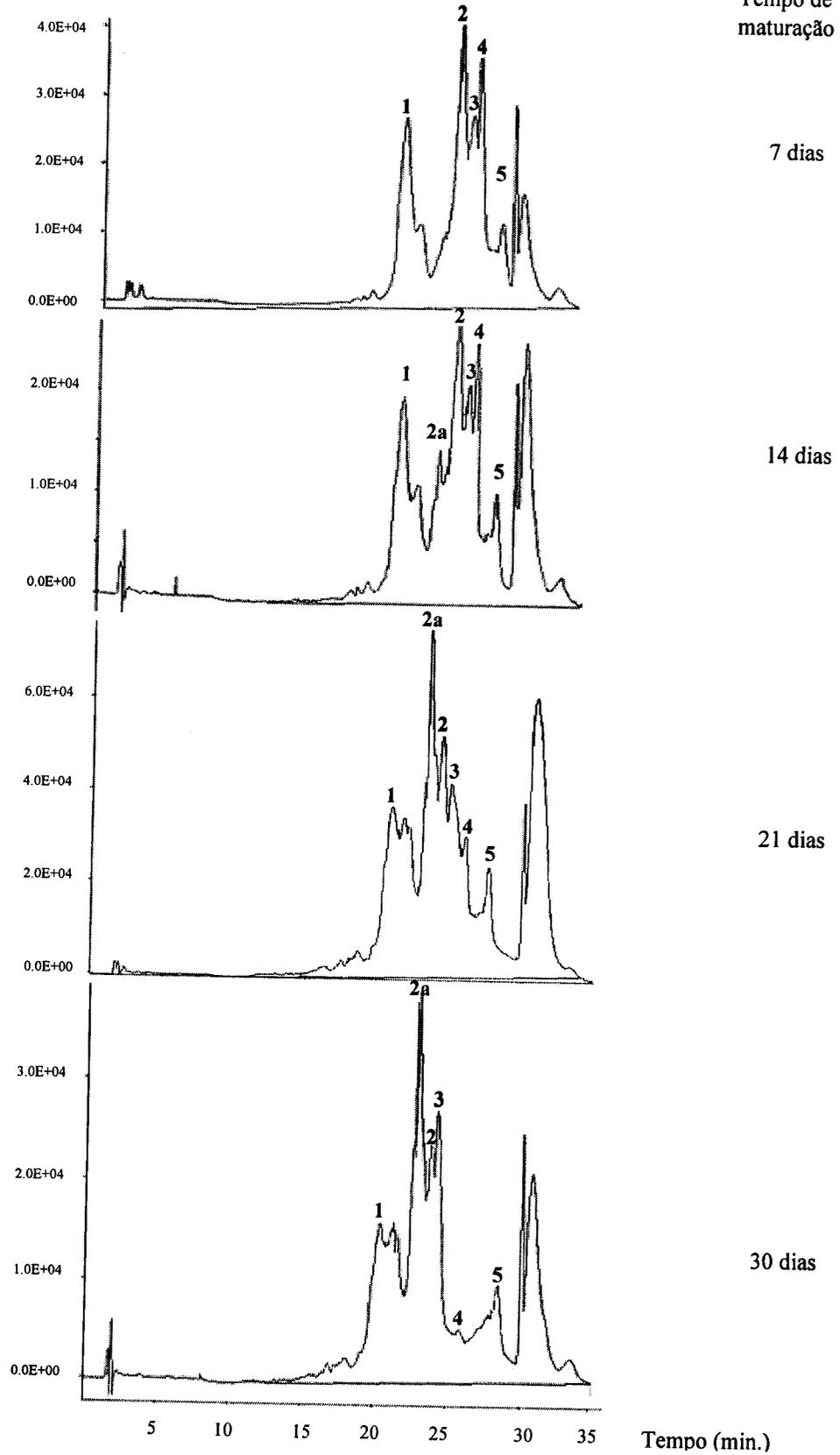


Figura 10 – Perfis cromatográficos obtidos por HPLC a 280 nm da fracção da caseína do queijo *Terrincho* ao longo da maturação, numeradas por ordem de eluição em picos: 1 (κ-caseína), 2 (α<sub>s2</sub>-caseína), 2a (α<sub>s1</sub>-I peptídeo), 3 (β<sub>2</sub>-caseína), 4 (α<sub>s1</sub>-caseína) e 5 (β<sub>1</sub>-caseína).

Evolução semelhante da proteólise foi observada por Veloso *et al.* (2004) para queijos tipo *Terrincho*, mas de reduzidas dimensões (~70g). Ao fim de 30 dias a fracção da  $\alpha_s$ -caseína está quase, completamente, hidrolisada.

Tal como foi referido atrás, verificou-se o aparecimento de dois picos com um tempo de eluição da ordem dos 31 minutos em todas as análises realizadas e que pode ser atribuído à eluição de pequenas quantidades de TFA, adsorvidas pelo enchimento da coluna e eluídas durante o retorno às condições iniciais (Elgar *et al.*, 2000).

### 3.2.4 1 – COMPARAÇÃO ENTRE OS QUEIJOS A E B

Antes de retirar quaisquer conclusões, em termos qualitativos, a partir dos resultados observados, foi necessário verificar se existiam *outliers* nos dados, assim como, se os dois queijos analisados (A e B) dentro de cada tipo de queijo e de cada tempo de maturação eram semelhantes no que respeita à composição das fracções de caseína.

Utilizando o teste *t* para duas amostras independentes, compararam-se as médias das áreas para cada pico cromatográfico (variáveis em estudo), nos queijos A e B.

Este teste tem como princípio a verificação de que determinada hipótese nula se confirma ou não, tal como se pode retratar pelo seguinte exemplo:

$H_0$  (hipótese nula): área pico 1 no queijo A = área do pico 1 no queijo B

$H_a$  (hipótese alternativa): área pico 1 no queijo A  $\neq$  área do pico 1 no queijo B

Conclui-se que, no geral, as diferenças entre os queijos *Terrincho* A e B não são significativas e que os dois queijos analisados em cada tempo de maturação evoluíram de forma semelhante (Anexo 1). Por este motivo no tratamento estatístico posterior, os dados dos dois queijos, em cada tempo de maturação, foram analisados em conjunto.

## 3.2.4.2 – EXPLORAÇÃO DOS DADOS DE HPLC

A exploração dos dados foi, também, realizada com o intuito de verificar previamente os seguintes pressupostos para a aplicação do ANOVA:

- Se as distribuições dentro de cada grupo tinham distribuição normal.
- Se as observações eram independentes entre si.
- Se as variâncias de cada grupo eram iguais entre si, ou seja, se havia homocedasticidade.

Foi possível aplicar os pressupostos do modelo ANOVA, uma vez que os valores obtidos para cada tempo de maturação apresentavam, de um modo geral, uma distribuição normal (Teste de Shapiro-Wilk – tamanho da amostra inferior a 50) e homocedasticidade de variâncias (Teste de Levene) – Anexo 2.

O tratamento estatístico ANOVA-One-Way foi usado, então, de forma a verificar se os valores das áreas obtidos para os principais picos (1, 2, 2a, 3, 4 e 5) podiam ou não, considerar-se significativamente diferentes, ao longo da maturação.

Na Figura 11 apresentam-se os diagramas de caixas e bigodes para cada uma das fracções de caseína e peptídeo  $\alpha_{S1-I}$ . Os resultados obtidos por ANOVA e testes *post hoc* (Tukey HSD) são resumidos na Tabela 7. Conclui-se, com 95% de confiança, que se verificavam diferenças significativas em todas as fracções quantificadas: picos 1, 2, 2a, 3, 4 e 5, devido ao efeito do tempo de maturação. Observou-se uma redução significativa no conteúdo das fracções correspondentes à  $\kappa$ -caseína (pico 1), à  $\alpha_{S1}$ -caseína (pico 4) e à  $\alpha_{S2}$ -caseína (pico 2), ao longo do tempo de maturação. Esta redução foi cerca de 40%, 80% e 75%, respectivamente, para a  $\kappa$ ,  $\alpha_{S1}$  e  $\alpha_{S2}$  caseínas. Ao fim de 30 dias verificou-se a hidrólise, quase completa, da  $\alpha_{S1}$ -caseína. Simultaneamente, constatou-se um aumento da fracção correspondente ao peptídeo  $\alpha_{S1-I}$  (pico 2a). Este facto deve-se à acção do coalho residual, juntamente com a acção de enzimas hidrolíticas de microrganismos presentes no queijo (Irigoyen *et al.*, 2000). No que diz

respeito à  $\beta_2$  e  $\beta_1$  caseínas (picos 3 e 5) verificaram-se algumas oscilações, sem que tenha ocorrido, no entanto, um decréscimo significativo. Assim, a fracção que corresponde às regiões das  $\beta$ -caseínas foi menos degradada do que aquelas que correspondem às  $\alpha$ -caseínas, as quais são hidrolisadas mais rapidamente, durante as primeiras fases da maturação. A maior resistência das  $\beta$ -caseínas à hidrólise foi já referida por vários autores para outros tipos de queijo (Irigoyen *et al.*, 2000).

Tabela 7 – Resultados do Anova - One-way e do teste post hoc (Tukey)

Variável	Tempo de maturação	N	Média das Áreas	Desvio Padrão	F	p
Pico 1	7	8	297048,2 <sup>a</sup>	10205,21	17.363	0,000
	14	8	198545,2 <sup>b, c</sup>	5056,8186		
	21	8	232943,3 <sup>b</sup>	19115,07		
	30	8	178282,9 <sup>c</sup>	11349,05		
Pico 2a	7	8	76378,403 <sup>a</sup>	3438,8246	30.145	0,000
	14	8	153389,6 <sup>b</sup>	6434,2303		
	21	8	264021,6 <sup>c</sup>	33332,00		
	30	8	309379,9 <sup>c</sup>	17837,05		
Pico 2	7	8	363613,5 <sup>a</sup>	9812,0436	125.114	0,000
	14	8	178730,8 <sup>b</sup>	4512,3680		
	21	8	164227,4 <sup>b</sup>	14506,97		
	30	8	121876,1 <sup>c</sup>	6287,6984		
Pico 3	7	8	182306,2 <sup>a</sup>	7438,2540	14.759	0,000
	14	8	114834,1 <sup>b</sup>	15031,77		
	21	8	193166,1 <sup>a</sup>	16624,41		
	30	8	156440,1 <sup>a</sup>	20512,56		
Pico 4	7	8	208370,2 <sup>a</sup>	7146,5821	71.248	0,000
	14	8	114483,5 <sup>b</sup>	4119,5810		
	21	8	98570,926 <sup>b</sup>	5634,1581		
	30	8	54458,786 <sup>c</sup>	12673,81		
Pico 5	7	8	128989,3 <sup>a</sup>	10216,18	4.698	0,009
	14	8	111708,6 <sup>a</sup>	6234,4712		
	21	8	202881,5 <sup>b</sup>	31144,71		
	30	8	142691,7 <sup>a, b</sup>	14955,98		

<sup>a, b, c</sup> - Para cada variável, os valores das médias sem índices comuns são significativamente diferentes (p<0,05).

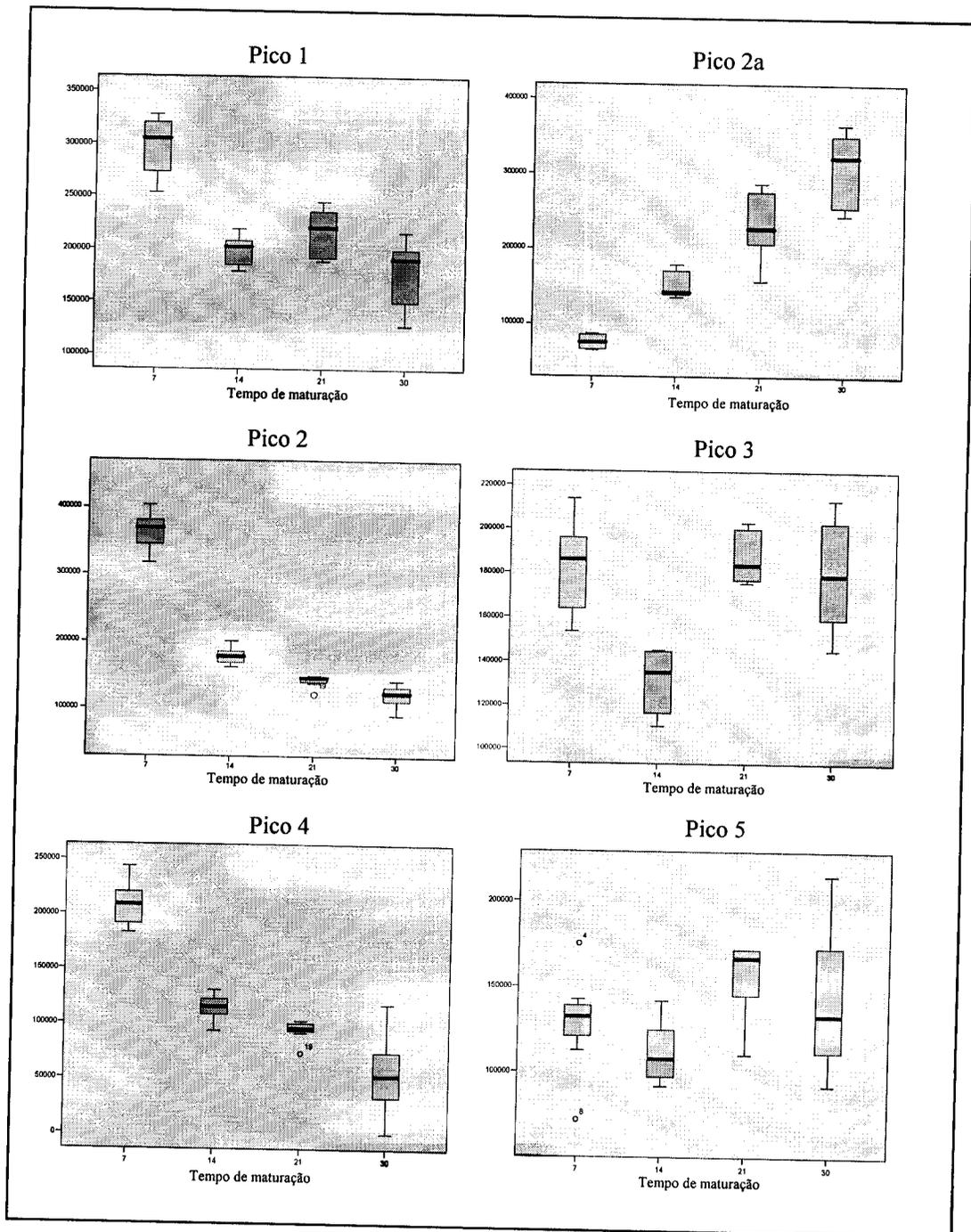


Figura 11 - Caixas de bigodes das áreas dos picos 1 ( $\kappa$ -caseína), 2a ( $\alpha_{S1}$ - I peptídeo), 2 ( $\alpha_{S2}$ -caseína), 3 ( $\beta_2$ -caseína), 4 ( $\alpha_{S1}$ -caseína) e 5 ( $\beta_1$ -caseína), resultantes da separação cromatográfica das fracções de caseína em queijos *Terrincho* DOP, ao longo da maturação.

### 3.3 – PREVISÃO DO TEMPO DE MATURAÇÃO DO QUEIJO TERRINCHO DOP EM FUNÇÃO DA PROTEÓLISE

Utilizaram-se conjuntamente os dados de HPLC dos queijos *Terrincho* DOP na obtenção de uma regressão linear múltipla, com o objectivo de prever o seu tempo de maturação. A vantagem de poder efectuar essa previsão reside no facto de que este queijo, por motivos de segurança alimentar, não pode ser comercializado sem que tenha transcorrido um período mínimo de 30 dias, a contar da data da sua preparação. Assim, e de forma a poder efectuar o controlo do tempo de maturação deste queijo e garantir que obedeça a este requisito, é importante poder estimar o seu tempo de maturação.

O tempo de maturação do queijo *Terrincho* foi estimado, recorrendo à selecção de variáveis por *stepwise*, a partir das seis variáveis em estudo, efectuando uma análise de regressão linear múltipla. A fórmula geral da equação é a seguinte:

$$Y = a_1 x_1 + a_2 x_2 + \dots + a_n x_n$$

Sendo  $y$  o tempo de maturação e  $x_1, x_2, \dots, x_n$  a área das principais fracções de caseína. Deste modo, verificou-se que era possível prever o tempo de maturação do queijo *Terrincho* DOP, utilizando a área dos picos 2a e 4 e uma constante, através da seguinte equação:

$$Y = 13.56 + 10.7 \times \text{pico 2a } (\alpha_{S1}\text{-I peptídeo}) - 11.8 \times \text{pico 4 } (\alpha_{S1}\text{-caseína}).$$

Desvio padrão = 2.5,  $R = 0.92$ ,  $n = 32$ ,  $p < 0.01$ .

A correlação entre os valores medidos e estimados é apresentada na Figura 12. Em resumo, o tempo de maturação pode ser estimado com base nas áreas do peptídeo  $\alpha_{S1}$ -I e da  $\alpha_{S1}$ -caseína, sendo o erro na estimativa de 2,5 dias.

Nesta regressão linear múltipla ficou evidente a importância da fracção de caseína  $\alpha_{S1}$  e do peptídeo que resulta da sua degradação, na evolução da proteólise durante os primeiros 30 dias de maturação. Está descrito na literatura que o primeiro local de acção da quimosina na  $\alpha_{S1}$ -caseína é a ligação Phe<sub>23</sub>-Val<sub>24</sub>, com a formação do peptídeo  $\alpha_{S1}$ -I, que por sua vez vai sofrer posterior hidrólise pela quimosina, levando à formação de outros produtos de degradação (Irigoyen *et al.*, 2000; Albillos *et al.*, 2005). Deste modo, justifica-se que a estimativa do tempo de maturação resulte do “balanço” entre o conteúdo destes 2 compostos.

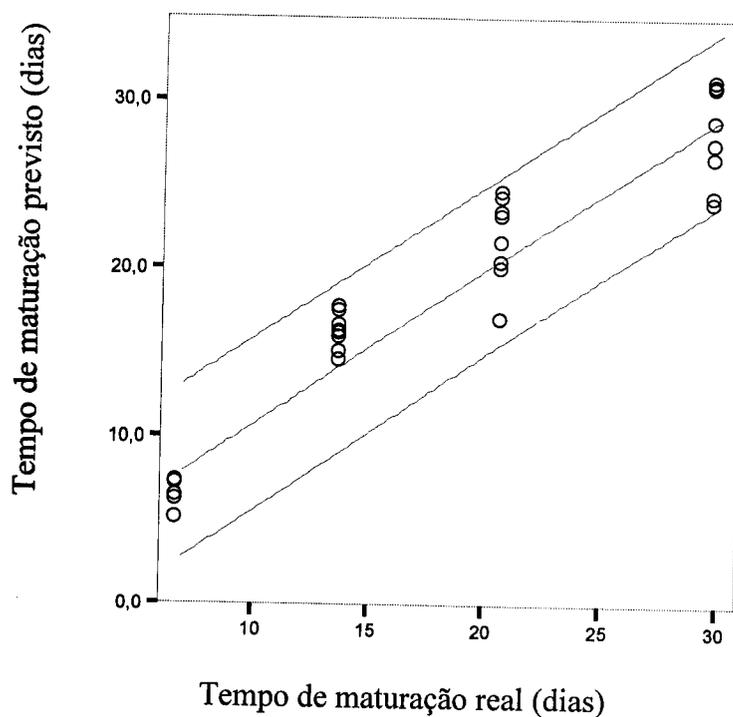


Figura 12 – Previsão do tempo de maturação do queijo *Terrincho*. Regressão linear com 95% de intervalo individual de previsão.

### 3.4 – AVALIAÇÃO DA AUTENTICIDADE DO QUEIJO *TERRINCHO*: COMPARAÇÃO COM A COMPOSIÇÃO DE QUEIJO DE VACA E QUEIJOS DE MISTURA

Os perfis das caseínas obtidos por HPLC e por Ureia-PAGE, juntamente com os dados de humidade, pH e conteúdo total de caseína, obtidos para o queijo *Terrincho*, ao longo da maturação, foram comparados com os mesmos dados dos queijos de vaca e de mistura. Procurou-se, deste modo, conhecer a evolução da proteólise, de forma a comparar as modificações no perfil das proteínas da fracção insolúvel a pH 4,3, não só no queijo DOP, mas também nos queijos de vaca e de mistura preparados nas mesmas condições daquele e garantir a autenticidade do queijo *Terrincho*.

#### 3.4.1 – HUMIDADE, pH E CASEÍNA TOTAL

Uma vez que a humidade e o pH são parâmetros que afectam a proteólise do queijo, efectuou-se a sua análise nas amostras de queijo *Terrincho*, de vaca e de mistura 1 e 2. O teor de humidade no queijo *Terrincho* decresceu progressivamente, ao longo do tempo de maturação, variando entre 50% e 47%, no entanto as diferenças não foram estatisticamente significativas. Comportamento semelhante foi observado para os queijos de vaca e para os queijos de mistura 1 e 2.

De um modo geral, os valores de pH do queijo *Terrincho* sofreram um decréscimo, ao longo do período de maturação (6,5 a 5,1). Este facto pode estar associado à degradação da lactose pela acção das bactérias ácido-lácticas, levando à formação de ácido láctico. Contudo, no período final da maturação, o valor de pH aumentou ligeiramente, provavelmente devido à hidrólise das proteínas com a

consequente libertação de ião amónia, associada à formação de compostos de nitrógeno alcalinos. Este facto foi já descrito para o queijo *Terrincho*, anteriormente, por Pinho *et al.*, 2004a), tendo-se também verificado para outros tipos de queijo um comportamento semelhante: o pH do queijo *Cheddar* aumentou 0,1 unidades, ao longo de 6 meses de maturação (Lawrence *et al.*, 1987); o pH do queijo *Gruyère* sofreu alterações de 5,35 a 5,95 (Lawrence *et al.*, 1987) e o do *Gouda* de 5,1 a 5,3-5,9 (dependendo da época de manufactura); o queijo *Camembert* apresentou aumentos superiores de pH, de 4,8 a um valor superior a 7,5 (Trieu-Cout e Gripon, 1982). Nos queijos de mistura 1 e 2 e nos queijos de vaca observou-se uma evolução semelhante nos valores de pH ao longo da maturação.

Utilizando as condições de precipitação das caseínas descritas anteriormente efectuou-se, para cada tempo de maturação, a precipitação das caseínas em dois troços diferentes dos queijos A e B. Os valores médios e respectivos desvios padrão obtidos ao longo da maturação, expressos em g de caseína por g de amostra, apresentam-se no gráfico da Figura 13.

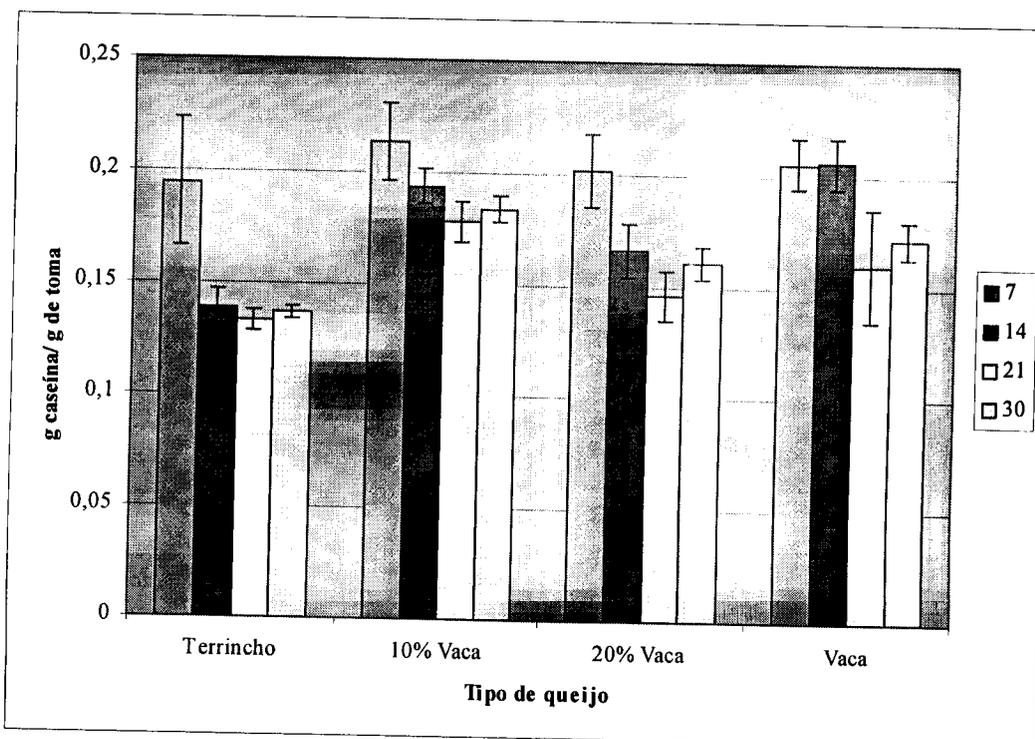


Figura 13 – Variação da caseína total nos queijos *Terrincho*, de mistura 1 e 2 (10% e 20% de vaca) e de vaca aos 7, 14, 21 e 30 dias de maturação.

O conteúdo total de caseína diminuiu ao longo da maturação. As principais modificações ocorreram entre os 7 e os 14 dias em todos os tipos de queijo, excepto no queijo de vaca, cuja variação mais significativa ocorreu entre os 14 e os 21 dias.

Convém realçar que, no início da maturação, não se verificaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no teor em caseína nos 4 tipos de queijo. No entanto, ao fim de 30 dias de maturação, o queijo *Terrincho* apresentava um teor de caseína total significativamente mais baixo que o dos queijos de mistura e de vaca.

### 3.4.2 – COMPARAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRACÇÃO INSOLÚVEL A pH 4,3 DOS QUEIJOS TERRINCHO, DE VACA, DE MISTURA 1 E 2

Os cromatogramas obtidos na análise da fracção de caseína dos queijos de vaca, após 7, 14, 21 e 30 dias de maturação são apresentados na Figura 14. Verificou-se que estes perfis cromatográficos eram diferentes quando comparados com os do queijo *Terrincho*, no que respeita às proporções das fracções de  $\kappa$ -caseína;  $\alpha$ -caseína e  $\beta$ -caseína (10:58:32 e 24:47:29, respectivamente) e nos seus tempos de retenção.

No entanto, a evolução da proteólise no queijo de vaca foi semelhante à verificada para o queijo *Terincho* (Figura. 15). Observou-se uma redução significativa no conteúdo das fracções correspondentes à  $\kappa$ -caseína (pico 1), à  $\alpha_{S1}$ -caseína (pico 4) e à  $\alpha_{S2}$ -caseína (pico 2), dependendo do tempo de maturação. A redução destas fracções ao fim de 30 dias de maturação foi cerca de 35, 80 e 70 % respectivamente, para a  $\kappa$ ,  $\alpha_{S2}$  e  $\alpha_{S1}$  caseínas. Simultaneamente, constatou-se um aumento da fracção correspondente ao peptídeo  $\alpha_{S1}$ -I (pico 2a). No que diz respeito ao queijo de vaca, este só apresentou  $\beta_1$ -caseína (pico 5), o que está concordante com a composição do leite de vaca descrita na literatura (Assenat, 1985). Verificaram-se algumas oscilações, sem que tenha ocorrido decréscimo desta fracção. Deste modo, tal como se verificou no queijo *Terrincho*, o pico que corresponde à região da  $\beta_1$ -caseína foi menos degradado durante os 30 dias de maturação.

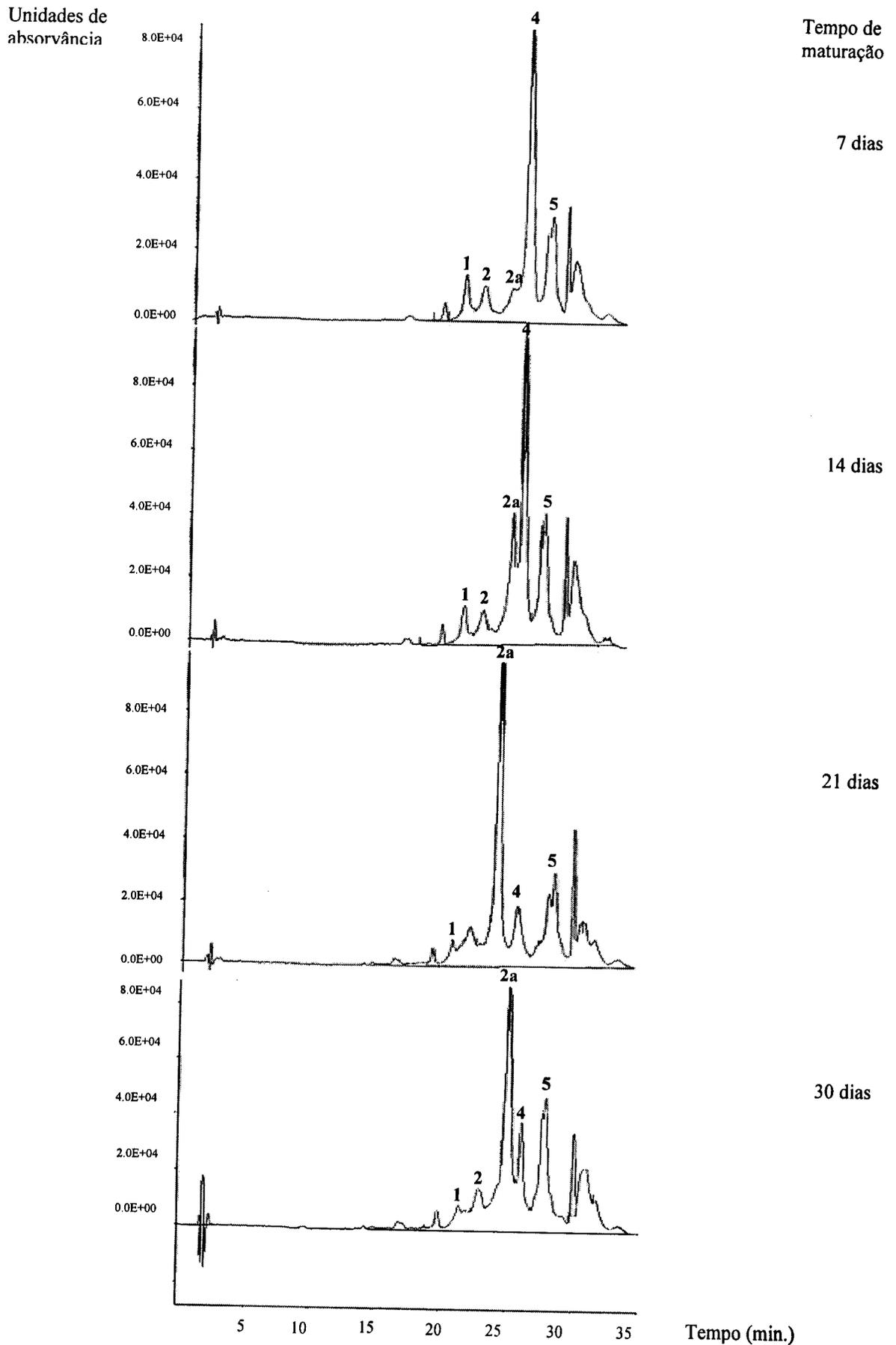


Figura 14 – Perfis cromatográficos obtidos por HPLC a 280 nm da fracção da caseína do queijo de vaca ao longo da maturação, numeradas por ordem de eluição em picos: 1 ( $\kappa$ -caseína), 2 ( $\alpha_{S2}$ -caseína), 2a ( $\alpha_{S1}$ - I peptídeo), 4 ( $\alpha_{S1}$ -caseína) e 5 ( $\beta_1$ -caseína).

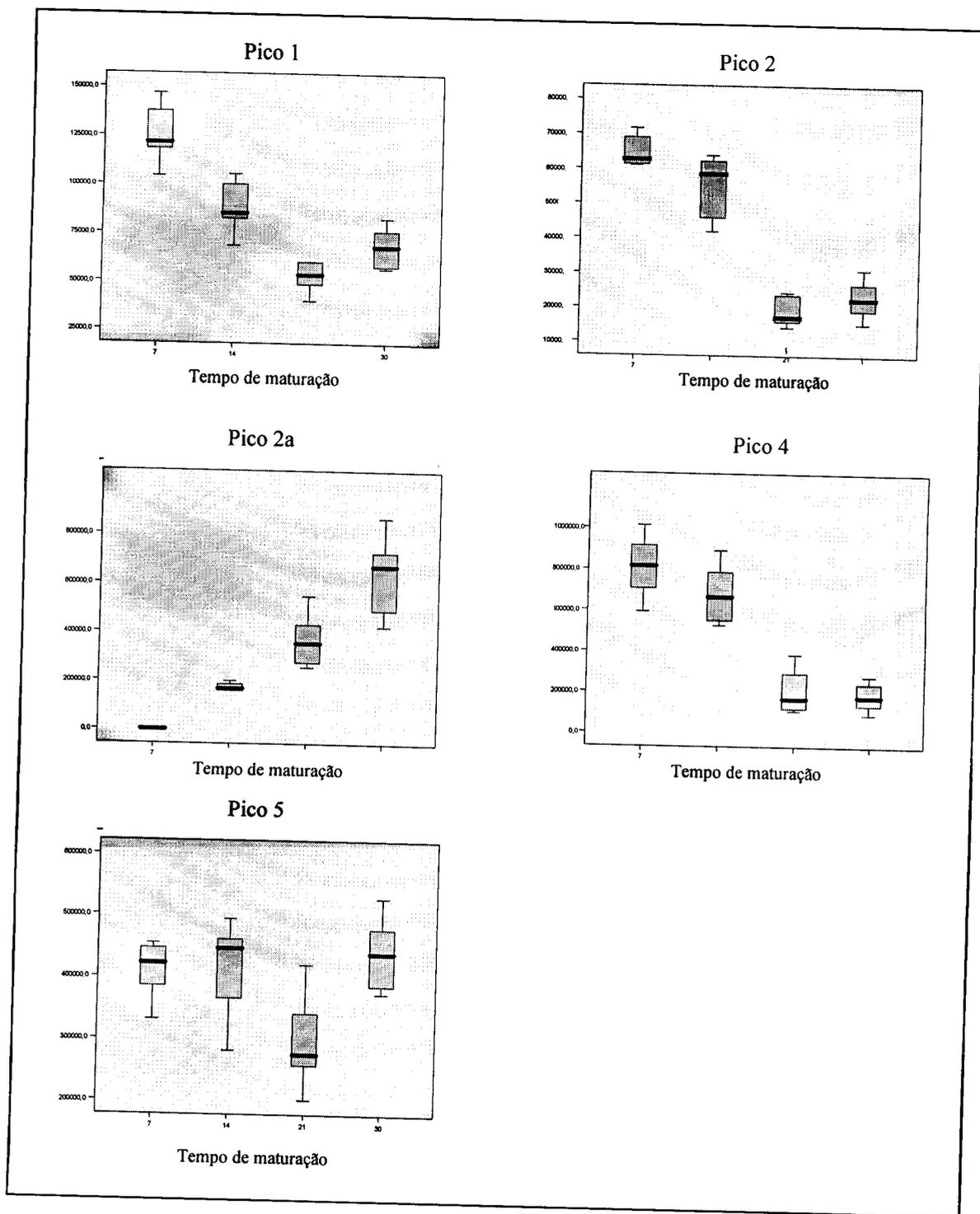


Figura 15 - Caixas de bigodes, representando a evolução das áreas dos picos 1 ( $\kappa$ -caseína), 2 ( $\alpha_{S2}$ -caseína), 2a ( $\alpha_{S1}$ - I peptídeo), 4 ( $\alpha_{S1}$ -caseína) e 5 ( $\beta_1$ -caseína), do queijo de vaca ao longo da maturação.

No que respeita aos perfis cromatográficos da fracção de caseína dos queijos de mistura 1 e 2, (contendo respectivamente, 10% e 20% de leite de vaca), após 7, 14, 21 e 30 dias de maturação estes são apresentados nas Figuras 16 e 17. Foi observado um comportamento semelhante em relação aos perfis cromatográficos das caseínas nos queijos de mistura 1 e 2, ao longo da maturação.

Ao efectuar a comparação entre a proteólise dos queijos de mistura e nos queijos *Terrincho* e de vaca, observou-se que esta decorreu de forma semelhante. No entanto, os cromatogramas da fracção insolúvel a pH 4,3 dos queijos de mistura 1 e 2 apresentaram diferentes perfis cromatográficos quando comparados com os destes queijos, devido às diferenças nos tempos de retenção da  $\alpha_{S1}$ -caseína bovina e ovina, o que resultou numa sobreposição do pico da  $\alpha_{S1}$ -caseína bovina, com a  $\alpha_{S1}$ - caseína ovina (pico 4) e a  $\beta_2$ -caseína ovina (pico 3). Este facto é mais evidente nos queijos de mistura 2, devido à maior quantidade de  $\alpha_{S1}$ -caseína bovina, que era a fracção mais abundante no leite de vaca.

Durante o período de maturação, a  $\alpha_{S1}$ -caseína (pico 4) sofreu hidrólise, e após 30 dias esta fracção era quase inexistente nos queijos *Terrincho* (cerca de 20% da inicial) e nos queijos de mistura 1, o que tornava a detecção da adulteração mais difícil. Os queijos de mistura 2 apresentavam um conteúdo mais elevado em  $\alpha_{S1}$ -caseína bovina (pico 4), pelo que esta fracção continuava nitidamente sobreposta à  $\beta_1$ -caseína (pico 3) e  $\alpha_{S1}$ -caseína (pico4) ovinas, aos 30 dias de maturação. Contudo, é de prever que com o decorrer da proteólise, a detecção da adulteração, pela simples observação dos cromatogramas, será mais difícil para tempos mais elevados de maturação.

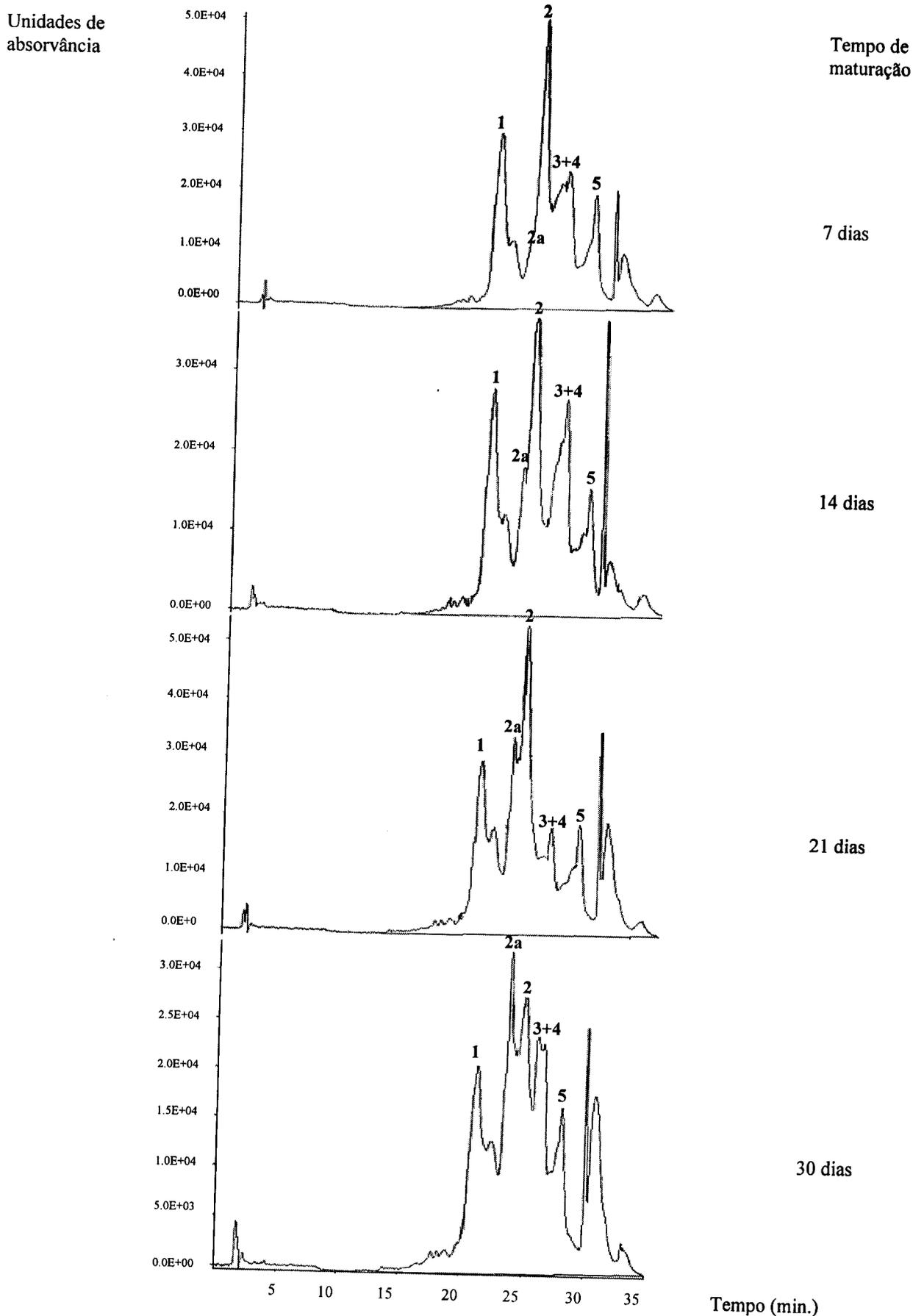


Figura 16 – Perfis cromatográficos obtidos por HPLC a 280 nm da fracção da caseína do queijo de mistura 1 (10% vaca) ao longo da maturação, numeradas por ordem de eluição em picos: 1 ( $\kappa$ -caseína), 2 ( $\alpha_{s2}$ -caseína), 2a ( $\alpha_{s1}$ - I peptídeo), 3 ( $\beta_2$ -caseína), 4 ( $\alpha_{s1}$ -caseína) e 5 ( $\beta_1$ -caseína).

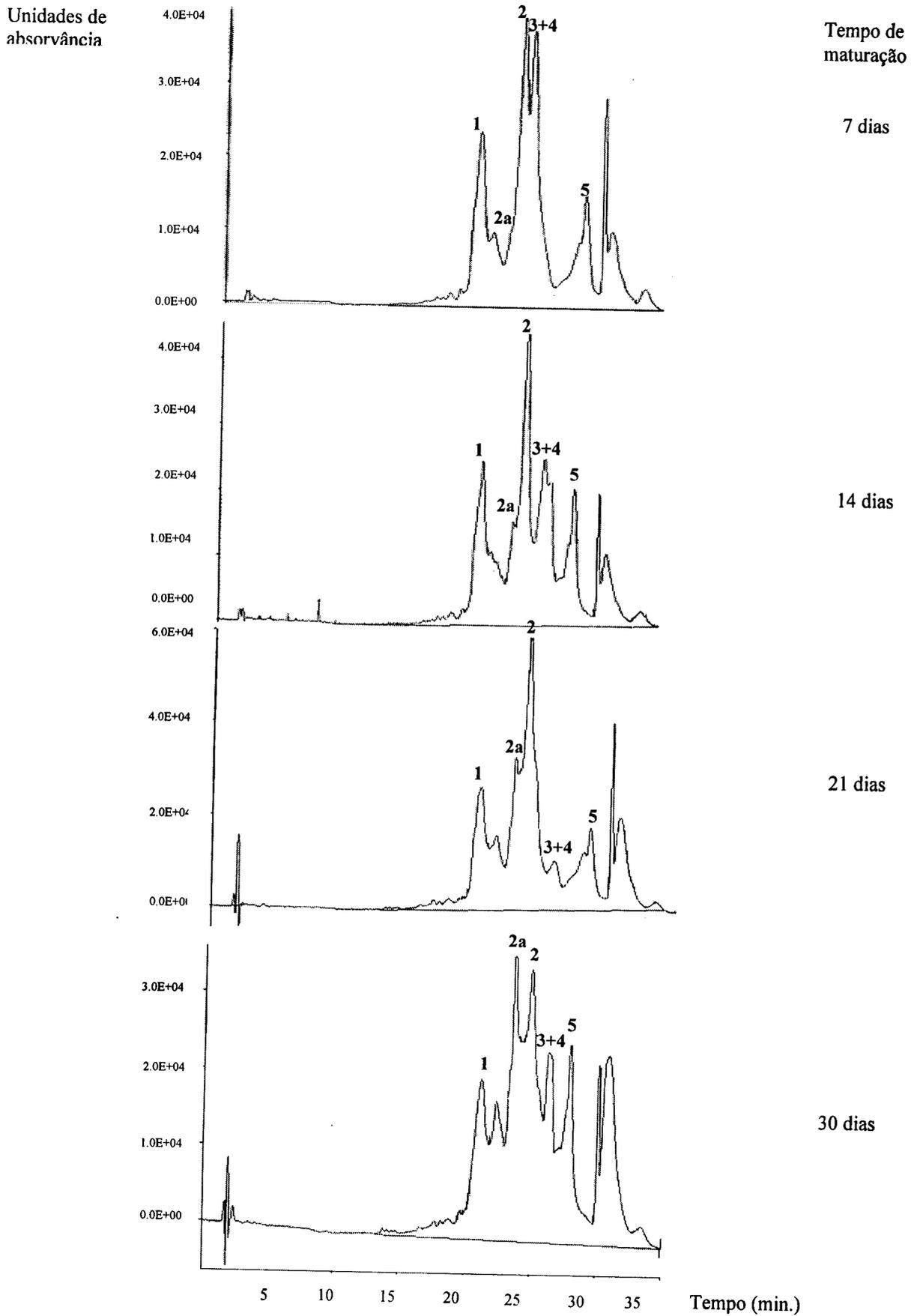


Figura 17 – Perfis cromatográficos obtidos por HPLC a 280 nm da fracção da caseína do queijo de mistura 2 (20% vaca) ao longo da maturação, numeradas por ordem de eluição em picos: 1 ( $\kappa$ -caseína), 2 ( $\alpha_{S2}$ -caseína), 2a ( $\alpha_{S1}$ - I peptideo), 3 ( $\beta_2$ -caseína), 4 ( $\alpha_{S1}$ -caseína) e 5 ( $\beta_1$ -caseína).

### 3.4.3 – COMPARAÇÃO DO PERFIL ELECTROFORÉTICO DA FRACÇÃO INSOLÚVEL A pH 4,3 NOS QUEIJOS TERRINCHO, DE MISTURA 1 E 2 E DE VACA

Na Figura 18 podem visualizar-se os perfis electroforéticos da fracção insolúvel a pH 4,3 dos leites de ovelha, do queijo *Terrincho*, dos queijos de mistura 1 e 2 e do queijo de vaca, no início da maturação. Verifica-se que no início da maturação o queijo *Terrincho* apresenta um perfil electroforético diferente dos queijos de mistura 1 e 2 e de vaca. Devido à diferente mobilidade electroforética da  $\alpha_{S1}$ -caseína bovina, esta pode utilizar-se como marcador da presença de leite de vaca em leite de ovelha (Veloso *et al.*, 2004).

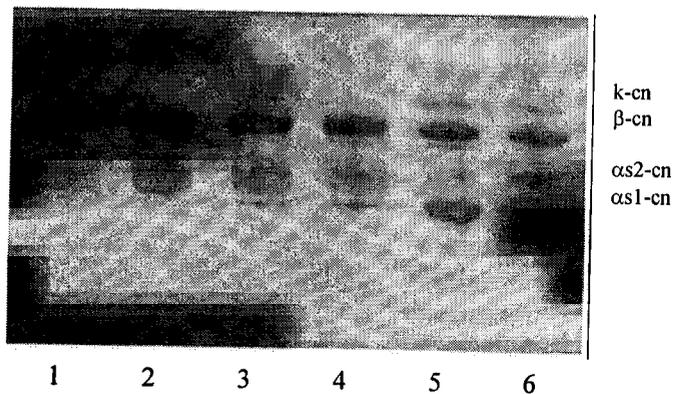


Figura. 18 – Electroforese por gel de Ureia-Poliacrilamida da fracção insolúvel a pH 4,3 de leite de ovelha (linha 1), queijos *Terrincho* (linha 2), queijos de mistura 1 e 2 (linhas 3 e 4, respectivamente), queijos de vaca (linha 5), no início da maturação e de leite de vaca (linha 6).

Contudo, em queijos maduros, apresentando um certo nível de proteólise, esta técnica já não pode ser aplicada para a detecção de leite de vaca em leite de ovelha, uma vez que os produtos que se formam em consequência da degradação da caseína apresentam uma mobilidade electroforética similar à da  $\alpha_{S1}$ -caseína bovina. Este facto pode ser constatado com a observação da Figura 19 onde se visualizam os perfis electroforéticos da fracção insolúvel a pH 4,3 dos leites de ovelha e de vaca, assim

como, dos queijos *Terrincho*, de mistura 1 e 2 e de vaca, após 30 dias de maturação.

Deste modo, a Ureia-PAGE pode ser considerada um método útil na detecção de leite de vaca em leite de ovelha, desde que não tenham ocorrido alterações proteolíticas apreciáveis, mas não pode ser aplicada a queijos maduros.

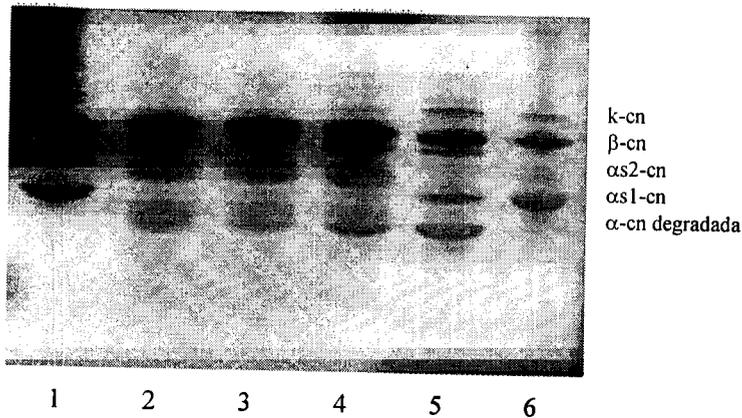


Figura. 19 – Electroforese por gel de Ureia-Poliacrilamida para a fracção insolúvel a pH 4.3 de leite de ovelha (linha 1), queijos *Terrincho* (linha 2), queijos de mistura 1 e 2 (linhas 3 e 4, respectivamente), queijos de vaca (linha 5), após 30 dias de maturação e leite de vaca (linha 6).

Para além disto, embora a Ureia-PAGE seja um método de separação útil para o estudo da proteólise do queijo, uma das suas principais limitações reside no facto das determinações quantitativas não serem demasiado precisas, pelos que os resultados devem ser interpretados com alguma reserva.

#### 3.4.4 – APLICAÇÃO DA ANÁLISE DISCRIMINANTE PARA A DISTINÇÃO DOS QUEIJOS *TERRINCHO*, DE VACA E DE MISTURA

Posteriormente aplicou-se a análise discriminante aos dados obtidos por HPLC, para os queijos *Terrincho*, de vaca e de mistura 1 e 2, com 30 dias de maturação. Apenas os picos correspondentes à κ-caseína (pico 1), peptídeo α<sub>S1</sub>-I (pico 2a), α<sub>S2</sub>-caseína (pico 2) e β<sub>1</sub>-caseína (pico 5) foram seleccionados. Os picos que apresentavam

uma sobreposição nos queijos de mistura, nomeadamente, a  $\alpha_{S2}$  caseína ovina e bovina (pico 4) e a  $\beta_2$ -caseína ovina (pico 3) foram excluídos.

A análise discriminante indicou que 3 variáveis contribuíram significativamente para explicar a variabilidade nos quatro tipos de queijo (Anexo 3). A  $\kappa$ -caseína (pico 1) e o peptídeo  $\alpha_{S1}$ -I (pico 2a) foram as fracções que mais contribuíram para a função 1 (*loadings* de  $-1,052$  e  $0,797$ , respectivamente). O pico da  $\kappa$ -caseína foi maior no queijo *Terrincho* e nos queijos de mistura e o pico do peptídeo  $\alpha_{S1}$ -I foi mais abundante nos queijos de vaca (*loading*  $0,797$ ). A  $\beta$ -caseína (pico 5) correlacionava-se positivamente com a função 2 (*loading*  $0,643$ ).

Como se representa na Figura 20, as duas principais funções explicam 97,8 % da variância total. O queijo de vaca distingue-se dos que contêm leite de ovelha devido ao menor teor de  $\kappa$ -caseína e maior quantidade de peptídeo  $\alpha_{S1}$ -I. As diferenças entre o queijo *Terrincho* e os queijos de mistura devem-se ao maior conteúdo em  $\beta$ -caseína (pico 5) nos queijos de mistura, devido ao facto de esta fracção ser mais elevada no leite de vaca e mais resistente à hidrólise enzimática até aos 30 dias de maturação. A função então obtida permite, assim, classificar todas as amostras de acordo com o tipo de queijo, com 100% de sucesso.

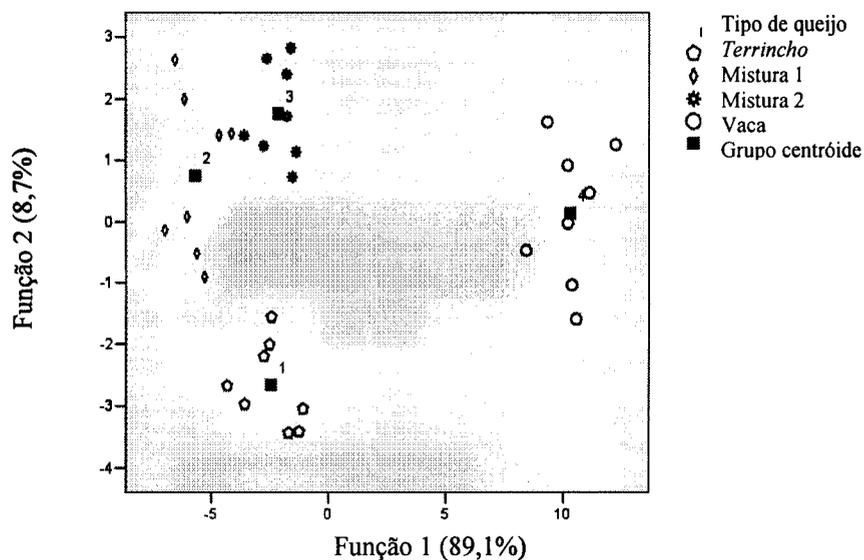


Figura 20 – Funções canónicas discriminantes para os queijos *Terrincho*, de vaca e de mistura 1 e 2, apresentando os 4 tipos de queijo classificados nas 2 principais funções propostas pelo modelo.

### 3.5 – INFLUÊNCIA DA ORIGEM DO LEITE NAS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DOS QUEIJOS

Os resultados obtidos para os 15 atributos avaliados pelo painel de provadores nos queijos *Terrincho*, de mistura e de vaca foram tratados estatisticamente.

Depois de feita a avaliação da normalidade, simetria e curtose para os diferentes atributos avaliados, constatou-se que não se verificava distribuição normal, no entanto, esta era simétrica e mesocúrtica (Anexo 4). Convém salientar que a normalidade não é restritiva para a aplicação da One-Way ANOVA quando o número de elementos em cada grupo é relativamente elevado, o que se verifica nesta situação. A não normalidade tem consequências mínimas na interpretação dos resultados a não ser que a distribuição seja muito enviesada, o que não ocorre dado que esta é simétrica. De igual modo o teste F é robusto a violações da homocedasticidade quando o número de observações em cada grupo é igual ou aproximadamente igual (Pestana e Gageiro, 2003). Por isso, foi aplicada a ANOVA na análise dos resultados de análise sensorial.

A análise de variância realizada, utilizando a escala de atributos sensoriais, foi indicativa da existência de diferenças significativas em alguns dos atributos considerados para o queijo *Terrincho*, comparativamente com os queijos de mistura e de vaca. Contudo, não se verificaram diferenças significativas entre os queijos de mistura 1 e 2, pelo que os atributos sensoriais destes queijos foram avaliados conjuntamente. A análise de variância referida indicou que não existiam diferenças significativas para o salgado e o ranço. Contudo, verificaram-se diferenças significativas para todos os outros atributos. O perfil descritivo sensorial para o queijo *Terrincho*, de mistura e de vaca apresenta-se na Figura 21.

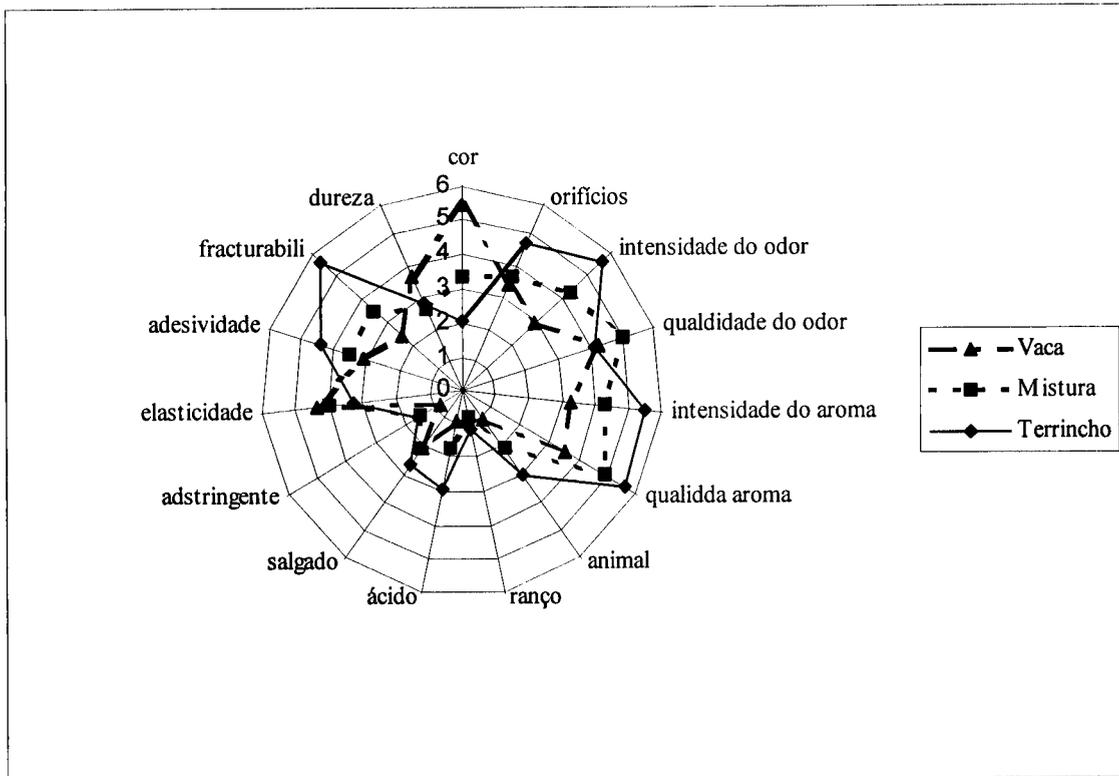


Figura 21 – Valores médios obtidos por 20 provadores para os 15 atributos avaliados nos queijos *Terrincho*, de mistura e de vaca.

O queijo *Terrincho* distinguiu-se dos queijos de mistura e de vaca devido à maior intensidade do odor e aroma, especialmente a animal e à maior acidez e adstringência. O que se justifica pela elevada quantidade de ácidos gordos deste queijo (Pinho *et al*, 2003b). O queijo de vaca apresentou valores mais baixos para estes atributos e os queijos de mistura apresentaram valores intermédios. No que diz respeito à textura, o queijo *Terrincho* apresentou níveis mais elevados de fracturabilidade e adesividade e menor elasticidade e dureza, que se podem correlacionar com o teor total de caseína.

Efectuou-se uma Análise de Componentes Principais com os resultados obtidos na análise sensorial, sendo possível reduzir a informação em duas componentes que justificam 68,4% da variância dos dados. A primeira componente sozinha justifica mais de 50% da variância (Anexo 4). O gráfico da Figura 22 condensa a informação obtida.

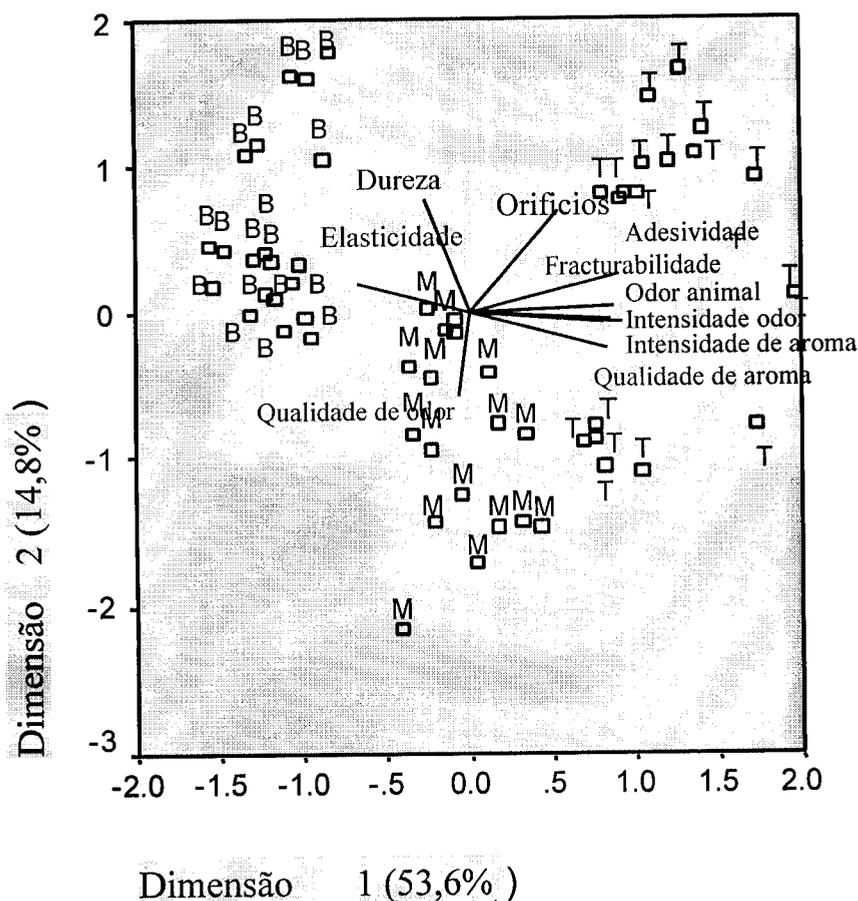


Figura 22 – Representação esquemática bidimensional da análise de componentes principais aplicada aos resultados da análise sensorial dos queijos *Terrincho* (T), de mistura (M) e bovino (B). A dimensão 1 explica 53,6% da variância e a 2 explica 14,8%.

A componente 1 está relacionada com a intensidade do odor, intensidade do aroma, cheiro a animal, sabor ácido, adesividade, fracturabilidade, que apresentam *loadings* positivos e a elasticidade que apresenta *loading* negativo. No que respeita à componente 2 esta está relacionada com fundamentalmente com os orifícios, a dureza e a qualidade do odor, esta última com *loading* negativo.

Como se pode verificar da análise da Figura 22, o painel de provadores conseguiu distinguir o queijo *Terrincho* DOP, dos queijos de mistura e do queijo bovino. No entanto, é importante avaliar a consistência interna dos factores que se relacionam com a proporção da variabilidade nas respostas que resulta de diferenças nos produtos em análise. O alpha de Cronbach é uma das medidas usadas para a verificação da consistência interna de um grupo de variáveis. Varia entre 0 e 1.

Neste caso temos um alpha de Cronbach de 0,913 para a componente 1 que é indicativo de uma consistência interna muito boa e um alpha de Cronbach de 0,423 para a componente 2 que é baixo. Ao analisar o gráfico conclui-se facilmente que a diferenciação dos queijos de acordo com a sua origem é feita na componente 1, a separação na componente 2 resulta fundamentalmente das diferenças entre os provadores para o mesmo queijo, nomeadamente, na avaliação da qualidade do odor, o que está concordante com os valores de alpha.

O queijo de ovelha apresentou menor quantidade de caseína, e é o que apresenta maior fracturabilidade, maior adesividade e menor elasticidade. Por outro lado o queijo de vaca, apresentou maior quantidade de caseína total, sendo o que tem maior elasticidade e simultaneamente, menor fracturabilidade e adesividade. O queijo de mistura está intermédio. Tudo aponta para existir uma relação entre estes parâmetros, um aspecto abordado por alguns autores (Malin e Brown, 1995).



## ***Conclusões Globais***

## CONCLUSÕES GLOBAIS

A metodologia de RP-HPLC utilizada neste trabalho revelou-se adequada para analisar a fracção insolúvel a pH 4,3 durante a maturação do queijo *Terrincho*, permitindo quantificar a degradação de caseína e estudar o efeito do tempo de maturação no processo proteolítico deste queijo.

Esta dissertação contribuiu para aprofundar os conhecimentos sobre a evolução da degradação de caseína ao longo da maturação do queijo *Terrincho*. Em particular, a relação entre a composição em caseínas, tempo de maturação, origem do leite e características sensoriais, que foi validada estatisticamente. Já existiam na literatura trabalhos relacionados com o uso de análise quimiométrica na avaliação do processo proteolítico de diferentes tipos de queijo, durante a maturação, assim como, para prever o tempo de maturação (Pham *et al.*, 1984; Santamaría *et al.*, 1986; García-Ruiz *et al.*, 1998; Herrero-Martínez *et al.*, 2000; Albillos *et al.*, 2005). No entanto, a informação disponível sobre a aplicação de análise estatística multivariada aos perfis de HPLC da fracção insolúvel a pH 4,3 para avaliar o tempo de maturação e autenticidade do queijo *Terrincho* é escassa (Velo, 2004).

Durante os 30 dias de maturação do queijo *Terrincho* verificou-se que as fracções de  $\beta$ -caseína eram resistentes à hidrólise pela quimosina residual e pelos microorganismos presentes no queijo, tal como observado em diversas variedades de queijo (Irigoyen *et al.*, 2000; Izco *et al.*, 1999). As fracções de  $\beta$ -caseína sofrem muito pouca proteólise pela quimosina do queijo, especialmente devido ao conteúdo em NaCl, que afecta a sua conformação. A agregação da  $\beta$ -caseína, induzida pelo sal, resulta na

inacessibilidade das ligações sensíveis à quimosina. Esta fracção é preferencialmente hidrolisada pela plasmina do leite, que ao valor de pH do queijo *Terrincho* está praticamente inactiva (Lawrence *et al.*, 1987).

Por seu turno, as fracções de  $\kappa$ ,  $\alpha_{S1}$  e  $\alpha_{S2}$  caseínas sofreram uma redução significativa ao longo da maturação do queijo *Terrincho* (respectivamente, 40%, 80% e 75 %), devido à hidrólise pela quimosina residual. Esta actua, inicialmente, na ligação Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> da  $\kappa$ -caseína, mas permanece activa durante a maturação do queijo, actuando igualmente nas fracções de  $\alpha$ -caseína e nos produtos resultantes da degradação destas proteínas.

A  $\alpha_{S1}$ -caseína e a  $\alpha_{S2}$ -caseína são significativamente hidrolisadas nas primeiras semanas de maturação do queijo *Terrincho*. O primeiro local de acção da quimosina na  $\alpha_{S1}$ -caseína é a ligação Phe<sub>23</sub>-Val<sub>24</sub>, com a formação do peptídeo  $\alpha_{S1}$ -I, que por sua vez vai sofrer posterior hidrólise por esta enzima, levando à formação de outros produtos de degradação (Albillos *et al.*, 2005). Deste modo, justifica-se que a regressão linear múltipla em *stepwise* para previsão do tempo de maturação, envolva as proporções de  $\alpha_{S1}$ -caseína e do peptídeo  $\alpha_{S1}$ -I e uma constante. O erro da estimativa é de 2,5 dias, sendo inferior ao erro da estimativa de 4,2 dias, obtido para o queijo *Terrincho* quando avaliado com base em parâmetros de cor e textura medidos instrumentalmente (Pinho, 2003; Pinho *et al.*, 2004c). Assim, é possível avaliar com maior rigor se o queijo *Terrincho* tem o tempo de maturação mínimo de 30 dias para ser colocado à venda.

Ao comparar a evolução da proteólise e parâmetros relacionados no queijo *Terrincho*, de vaca e de mistura, manufacturados exactamente nas mesmas condições, verificou-se uma evolução semelhante no teor de humidade e pH, que se reflectiu numa evolução semelhante da percentagem de degradação das fracções de caseína. Contudo, dado que as proporções destas fracções no leite de ovelha, de vaca e nas misturas eram diferentes, a quantidade de caseína intacta remanescente ao fim de 30 dias de maturação apresentou teores e composição diferentes nos quatro tipos de queijo estudados.

O teor de humidade no queijo *Terrincho*, de vaca e de mistura decresceu progressivamente, ao longo do tempo de maturação, variando entre 50% e 47%. No entanto, as diferenças não foram estatisticamente significativas. O mesmo se verificou com os valores de pH que sofreram um decréscimo, ao longo do período de maturação

(6,5 a 5,1), o que se justifica pela degradação da lactose pela acção das bactérias ácido-lácticas, levando à formação de ácido láctico. Contudo, no período final da maturação, o valor de pH aumentou ligeiramente, provavelmente devido à hidrólise das proteínas com a consequente libertação de ião amónia, associada à formação de compostos de nitrogénio alcalinos.

Ao fim de 30 dias de maturação o queijo *Terrincho* apresentou um teor mais baixo de constituintes da fracção insolúvel a pH 4,3, quando comparado com os de mistura e de vaca, provavelmente devido ao facto de a proporção de  $\kappa$ -caseína e  $\alpha_{S2}$ -caseína serem mais elevadas no leite de ovelha estreme e estas fracções se degradarem significativamente nas fases iniciais da maturação com formação de peptídeos solúveis. Além disso, este queijo apresenta menor quantidade de  $\beta$ -caseínas que são pouco hidrolisadas durante os 30 dias de maturação.

O queijo de vaca ao longo da maturação sofreu, igualmente, uma redução significativa no conteúdo das fracções correspondentes à  $\kappa$ -caseína,  $\alpha_{S1}$ -caseína e  $\alpha_{S2}$ -caseína, respectivamente de 35, 80 e 70 %. Simultaneamente, constatou-se um aumento da fracção correspondente ao peptídeo  $\alpha_{S1}$ -I. O que indicou que, embora as proporções destas fracções fossem quantitativamente diferentes no leite de vaca, a percentagem de degradação ao longo dos 30 dias de maturação foi próxima, sendo cerca de 5 % inferior para a  $\kappa$ -caseína,  $\alpha_{S2}$ -caseína.

Nos queijos de mistura 1 e 2 a evolução da proteólise ao longo dos 30 dias de maturação foi semelhante à verificadas nos queijos *Terrincho* e nos de vaca. A eluição da fracção  $\alpha_{S1}$  da caseína bovina ocorre a um tempo de eluição ligeiramente diferente da ovina, sobrepondo-se no cromatograma os picos de  $\beta_2$ - e  $\alpha_{S1}$ -caseínas ovinas com a  $\alpha_{S1}$ -caseína bovina, resultando nos cromatogramas da fracção insolúvel a pH 4,3 dos queijos de mistura um cromatograma com menos um pico cromatográfico, que permite detectar a adição de leite de vaca nos queijos de mistura. Kaminarides *et al.* (1993) também verificaram diferenças no tempo de eluição na fracção  $\alpha_{S1}$  da caseína bovina e ovina, em misturas de leite de vaca e de leite de ovelha analisadas por HPLC de troca aniónica. No entanto, nos queijos com 30 dias de maturação, a extensa degradação das  $\alpha_{S1}$ -caseínas ovina e bovina torna difícil a detecção da adição de 10% de leite de vaca. É de

prever que o mesmo irá ocorrer para tempos de maturação superiores no queijo com 20% de leite de vaca.

A separação por Ureia-PAGE, é uma das técnicas mais antigas para a detecção da adição de leite de bovino noutros tipos de leite. Também nesta metodologia, a  $\alpha_{S1}$ -caseína bovina é usada como um marcador da presença de leite de bovino em leite de ovino e em queijos no início da maturação. No entanto, no queijo *Terrincho*, de vaca e de mistura com 30 dias de maturação, esta técnica não é adequada para a detecção de leite de bovino devido à hidrólise da  $\alpha_{S1}$ -caseína, juntamente com a formação de produtos de degradação das proteínas, que apresentam mobilidade electroforética semelhante à da  $\alpha_{S1}$ -caseína bovina.

A análise discriminante aplicada aos dados de HPLC aos 30 dias de maturação indicou que as diferenças entre a fracção de caseína dos queijos *Terrincho* e de mistura eram devidas fundamentalmente ao conteúdo de  $\beta_1$ -caseína. A função obtida foi capaz de classificar todas as amostras de acordo com o tipo de queijo com 100% de sucesso.

O perfil descritivo sensorial do queijo *Terrincho* distinguiu-o dos queijos de mistura e de vaca devido à sua maior intensidade do odor e do aroma, especialmente a animal, superior acidez e adstringência. Os queijos de vaca apresentaram valores mais baixos para estes atributos e os queijos de mistura tinham valores intermédios. O que se justifica pela composição em ácidos gordos voláteis (de cadeia curta e média) ser mais elevada no leite de ovelha, levando à formação de elevado número de compostos voláteis como metilcetonas, entre outros (Pinho, 2004b).

Em termos de textura, o queijo *Terrincho* apresentou maior fracturabilidade e adesividade, assim como, menor elasticidade e dureza. Estes parâmetros estão correlacionados com a proteólise e o teor total de caseína.

De acordo com Lawrence (1987), a textura do queijo modifica-se nas primeiras semanas de maturação, devido à hidrólise da  $\alpha_{S1}$ -caseína com formação do peptídeo  $\alpha_{S1}$ -I, resultando num enfraquecimento da rede de caseína. No entanto, a taxa de proteólise das restantes caseínas e dos peptídeos formados vai também condicionar a textura do queijo. Esta taxa de proteólise é controlada principalmente pela proporção de renina residual e de plasmina no queijo, pela razão entre o sal e a humidade e pela

temperatura de armazenamento. Quanto mais pequena for a razão entre a taxa de humidade e a caseína total, mais firme será a matriz da caseína no queijo. Como o queijo *Terrincho* apresentou um teor mais baixo de caseína total e um teor de humidade semelhante ao de mistura e de vaca, justifica-se a sua menor dureza e a maior fracturabilidade e adesividade, uma vez que a matriz de caseína está mais enfraquecida.

Em conclusão, a análise quimiométrica dos perfis de HPLC da fracção insolúvel a pH 4,3 do queijo, provou ser um método fiável de obter informações sobre o processo bioquímico da proteólise do queijo *Terrincho* e para prever o tempo de maturação. Revelou-se também útil na avaliação da autenticidade deste queijo, embora se tenha confirmado que as caseínas não são um marcador de eleição para avaliar a autenticidade do queijo, em virtude da degradação que sofrem ao longo da maturação.

## ***Bibliografia***

- 
- Aimutis, W. R.; Eigel, W. M., 1982, "Identification of  $\lambda$ -casein as plasmin-derived fragments of bovine  $\beta$ -casein", *J. Dairy Sci.*, 65:175.
  - Albillos, S. M.; Busto, M. D.; Mateos, M. P.; Ortega, N., 2005, "Chemometrical Analysis of capillary electrophoresis casein fractions for predicting ripening times of milk mixture cheeses", *J. Agric. Food Chem.*, (em impressão, disponível on line).
  - Alfa-Laval, 1981, "System Solutions for Dairy Sheep". Alfa-Laval Agri International AB, Tumba, Sweeden.
  - Amigo, L., 1989, "Proteínas de leche de vaca, oveja y cabra. Estudio comparativo", *Alimentacion*, enero-febrero :211.
  - Amigo, L.; Ramos, M.; Martin-Alvarez, P. J., 1991, "Effect of technological parameters on electrophoretic detection of cow's milk in ewe's milk cheeses", *J. Dairy Sci.*, 74, 5:1482.
  - Andrews, A. T., 1983, "Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins", *J. Dairy Res.*, 50:45.
  - Aslam, M.; Hurley, W. L., 2003, [www.aces.uiuc.edu/~ansystem/dairyrep96/Aslam.html](http://www.aces.uiuc.edu/~ansystem/dairyrep96/Aslam.html)
  - Assenat, L., 1985, "Le lait de brevis: composition et propriétés", in Laits et produits laitiers: Vache, Brevis, Chèvre, F.M. Luquet (editor), Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, France.
  - Barbosa, L., 1998, "Processo de controlo e certificação do queijo Terrincho denominação de origem protegida", *Via Láctea*, nº13, Julho: 43.

- 
- Bárcenas, F. J.; Pérez-Elortondo, F. J.; Albisu, M., 2000, "Selection and screening of a descriptive panel for ewes milk cheese sensory profiling", *J. Sensory Studies*, 15:7.
  - Bárcenas, P.; Elortondo, P. F J.; Salmerón, J.; Albisu, M., 2001, "Sensory profile of ewes`milk cheeses", *Food Sci. Technol. Int.*, 7(4):347.
  - Bárcenas, P.; Elortondo, P. F J.; Albisu, M., 2004, "Projective mapping in sensory analysis of ewes milk cheeses: A study on consumers and trained panel performance", *Food Res. Int.*, 37:723.
  - Barron, L. J. R.; Redondo, Y.; Flanagan, C. E.; Pérez-Elortondo, F. J.; Albisu, M.; Nágera, A. I.; Renobales, M.; Fernández-García, E., 2005, "Comparison of the volatile composition and sensory characteristics of Spanish PDO cheeses manufactured from ewes`raw milk and animal rennet", *Int. Dairy J.*, 15:371.
  - Bastian, E. D.; Brown, R. J., 1996, "Plasmin in milk and dairy products", *Int. Dairy J.*, 6:435.
  - Benfeldt, C.; Sørensen, J.; Ellegard, K. H.; Petersen, T. E., 1997, "Heat treatment of cheese milk: Effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening", *Int. Dairy J.*, 7:723.
  - Berger, Y. M., 2003, "Sheep`s milk and its uses", [www.sheepmilk.biz/toppage1.htm](http://www.sheepmilk.biz/toppage1.htm).
  - Bobe, G.; Beitz, D. C.; Freeman, A. E.; Lindberg, G. L., 1998, "Separation and quantification of bovine milk proteins by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2:458.
  - Bottero, M. T.; Civera, T.; Anastasio, A.; Turi, R. M.; Rosati, S., 2002, "Identification of cow`s milk in «buffalo» cheese by duplex polymerase chain reaction", *J. Food Prot.*, 65, 2:362.

- 
- Bottero, M. T.; Civera, T.; Nucera, D.; Rosati, S.; Sacchi, P.; Turi, R. M., 2003, "A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cow's, goats' and sheeps' milk in dairy products", *Int. Dairy J.*, 13: 277.
  - Bradford, M. M., 1976, "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding", *Anal. Biochem.*, 72:248.
  - Bramanti, E.; Quigley, W. W. C.; Sortino, C.; Beni, F.; Onor, M.; Raspi, G.; Synovec, R. E., 2004, "Multidimensional analysis of denatured milk proteins by hydrophobic interaction chromatography coupled to a dynamic surface tension detector", *J. Chromatogr. A*, 1023:79.
  - Browmik, T.; Marth, E. H., 1990a, "Esterases of *Micrococcus* species: Identification and partial characterization", *J. Dairy Sci.*, 73:33.
  - Browmik, T.; Marth, E. H., 1990b, "Micrococcus and *Pediococcus* species in cheese ripening (A review)", *J. Dairy Sci.*, 73:859.
  - Bustamante, M. A.; Virto, M. A.; Aramburu, M.; Barron, L. J. R.; Perez-Elortondo, F. J.; Albisu, M.; Renobales, M., 2003, "Lamb rennet paste in ovine cheese (idiazabal) manufacture. Proteolysis and relationship between analytical and sensory parameters", *Int. Dairy J.*, 13:547.
  - Canada, J. S. B., 1998, "Caracterização dos queijos tradicionais portugueses", *Via Lactea*, nº12, Janeiro :32.
  - Candrian, U.; Meyer, R., 1995, "Applications of Nucleic Acids Amplification Methods in Food Analysis", Current States and Future trends, Euro Food chem VIII, Viena-Áustria.

- 
- Cartoni, G.; Coccioli, F.; Jasionowska, R.; Masci, M., 1999, "Determination of cow's milk in goat's milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions", *J. Chromatogr. A*, 846:135.
  - Casper, J. L.; Wendorff, W. L.; Thomas, D. L., 1998, "Seasonal changes in protein composition of whey from commercial manufacture of caprine and ovine specialty cheeses", *J. Dairy Sci.*, 81:3117.
  - Cayot, P.; Lorient, D., 1997, "Structure-function relationships of whey proteins", in Food proteins and their applications, S. Damodaran e A. Paraf (editor), Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque.
  - Chamba, J. F.; Perreard, E., 2002, "Contribution of propionic acid bacteria to lipolysis of Emmental cheese", *Lait*, 82:33.
  - Christensen, T. M. L. E.; Kristiansen, K. R., Masci, M. D., 1989, "Proteolysis in cheese investigated by high performance liquid chromatography", *J. Dairy Res.*, 56:823.
  - Collins, Y. F.; McSweeney, P. L. H.; Wilkinson, M. G., 2003, "Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge", *Int. Dairy J.*, 13:841.
  - Cordella, C.; Moussa, I.; Martel, A. C.; Sbirrazzuoli; Cuvelier, L. L., 2002, "Recent Developments in Food Characterization and Adulteration Detection: Technique-Oriented Perspectives", *J. Agric. Food Chem.*, 50:1751.
  - Costa, A. F., 1994, "Fármacos Gordos" in Farmacognosia, I Volume, 5ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
  - Creamer, L. K.; Lawrence, R. C.; Gillies, J., 1985, "Effect of acidification of cheese milk on the resultant Cheddar cheese. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 20:185.

- 
- de Jong, N.; Visser, S.; Olieman, C., 1993, "Determination of milk proteins by capillary electrophoresis", *J. Chromatogr.*, 652:207.
  - de Jong, C.; Badings, T., 1990, "Determination of free fatty acids in milk and cheese, procedures for extraction, clean up and capillary gas chromatographic analysis", *J. High Resolut. Chromatogr.*, 13:94.
  - Dennis, M. J., 1998, "Recent developments in food authentication", *Analyst*, 123:151R.
  - Despacho 16/94, Diário da República II Série nº21 de 26 de Janeiro de 1994 (Anexos I e II).
  - Drake, M. A.; Yates, M. D.; Gerard, P. D.; Delahunty, C. M.; Sheehan, E. M.; Turnbull, R. P.; Dodds, T. M., 2005, "Comparison of differences between lexicons for descriptive analysis of Cheddar cheese flavour in Ireland, New Zealand, and United States of America", *Int. Dairy J.*, 15:473.
  - Elgar, D. F.; Norris, C. S.; Ayers, J. S.; Pritchard, M.; Otter, D. E.; Palmano, K. P., 2000, "Simultaneous separation and quantification of the major bovine whey proteins including proteose peptone and caseinomacropeptide by reversed-phase high performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, 878:83.
  - Ettre, L. S., 1980 in High Performance Liquid Chromatography-Advances and Perspectives, Horvarth, C. (ed.), Academic Press, New York.
  - Faria, M. A.; Ferreira, M. A., 1999, "Análises de Ácidos Nucleicos pela Técnica de PCR e sua Aplicação na Área Alimentar", *Revista Portuguesa de Farmácia*, XLIX, 1, Jan/Fev/Mar: 31.
  - Farkye, Y. N.; Fox, P. F., 1990, "Objective indices of cheese ripening", *Trends in Food Sci. & Tech.*, August :37.

- 
- Fedrick, I. A.; Dullely, J. R., 1984, "The effect of elevated storage temperatures on the rheology of Cheddar cheese", *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 19:141.
  - Fennema, O. R.; 1996, in Food Chemistry. O. R. Fennema, ed. Marcel Dekker, Inc., New York.
  - Ferreira, M. A., 1999, "Dificuldades de avaliação da autenticidade dos produtos alimentares", 4º Encontro de Química dos Alimentos, Coimbra, Livro de Actas:89.
  - Ferreira, I. M. P. L. V.; Caçote, H., 2003, "Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in Protected Denomination of Origin (PDO) Cheeses by RP-HPLC of  $\beta$ -lactoglobulins", *J. Chromatogr. A*, 1115:111.
  - Foegeding, E. A.; Brown, J.; Drake, M.; Daubert, C. R., 2003, "Sensory and mechanical aspects of cheese texture - review", *Int. Dairy J.*, 13:585.
  - Fox, P. F., 1989, "Proteolysis during cheese manufacture and ripening", *J. Dairy Sci.*, 72, 6:1379.
  - Fox, P. F., 2000, "The major constituents of milk", in Dairy Processing, Edited by Gerrit Smit, CRC Press LLC, Boca Raton, USA.
  - Fox, P. F.; MacSweeney, P. L. H., 1998, "Milk Proteins" in Dairy Chemistry and Biochemistry, 1ª Edição, Capítulo 4, Blackie Academic & Professional, London.
  - Fox, P. F.; Guinee, T. P.; Cogan, T. M.; McSweeney, P. L. H., 2000a "Biochemistry of Cheese Ripening", in Aspen Publishers Inc. Fundamentals of Cheese Science, Gaithersburg, Maryland.
  - Fox, P. F.; Guinee, T. P.; Cogan, T. M.; McSweeney, P. L. H., 2000b, "Enzymatic Coagulation of milk", in Aspen Publishers Inc. Fundamentals of Cheese Science, Gaithersburg, Maryland.

- 
- Fox, P. F.; Guinee, T. P.; Cogan, T. M.; McSweeney, P. L. H., 2000c, "Microbiology of Cheese Ripening", in Aspen Publishers Inc. Fundamentals of Cheese Science, Gaithersburg, Maryland.
  - Garcia, H. S.; Reyes, H. R.; Malcata, F. X.; Hill, C. G., 1990, "Determination of the major free fatty acids in milk fat using a three component mobile phase for HPLC analysis", *Milchwissenschaft*, 45:757.
  - García, T.; Martín, R., Rodríguez, E.; Azcona, J. I.; Sanz, B.; Hernández, P. E., 1991, "Detection of Bovine Milk in Ovine Milk by a Sandwich Enzyme-Linked Immunorbent Assay (ELISA)", *J. Food Protection*, 54, 5:366.
  - García-Ruiz, A.; Cabezas, L.; Martín-Alvárez, P. J.; Cabezudo, D., 1998, "Prediction of the ripening times of Manchego cheese using multivariate statistical análisis: a preliminary study", *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 206:382.
  - Gomez-Ruiz, J. A.; Ballasteros, C.; Vinas, L. C.; Martinez-Castro, I., 2002, "Relationships between volatile compounds and odour in Manchego cheese: Comparison between artesanal and industrial cheeses at different ripening times", *Lait*, 82:613.
  - Gonçalves, M. L. S. S., 1990, in "Métodos Instrumentais para Análise de Soluções – Análise Quantitativa" – 2ª edição - Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
  - González, C.; Fluentes, C.; Andrés, A.; Chiralt, A.; Fito, P., 1999, "Effectiveness of vacuum impregnation brining pf Manchego-type curd, *Int. Dairy J.*, 9:143.
  - González, A. F. C.; Vallejo, B. C., 2001, "Quantitative determination of short-chain free fatty acids in milk using solid-phase microextraction and gas chromatography", *J. Agric. Food Chem.*, 49:4603.

- 
- Grappin, R.; Rank, T. C.; Olson, N. F., 1985, "Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review", *J. Dairy Sci.*, 68:531.
  - Grappin, R.; Ribadeau-Dumas, B., 1992, "Analytical methods for milk proteins", in *Advanced dairy chemistry – 1: Protein*, P. F. Fox (editor), Blackie Academic & Professional, 2ª edição, London.
  - Guillou, H.; Pelissier, J. P.; Grappin, R., 1986, "Méthodes de dosage des protéines du lait de vache", *Le Lait*, 66: 143.
  - Gunasekaran, S.; Mehmet Ak, M., 2003, "Cheese making - An overview" in *Cheese Rheology and Texture*, CRC Press, Boca Raton, USA.
  - Hannon, J. A.; Wilkinson, M. G.; Delahunty, C. M.; Wallace, J. M.; Morrissey, P. A.; Beresford, T. P., 2005 "Application of descriptive sensory analysis and key chemical indices to assess the impact of elevated ripening temperatures on the acceleration of Cheddar cheese ripening", *Int. Dairy J.*, 15:263.
  - Haza, A. I.; Morales, P.; Ikken, Y.; Martinez, A.; Sanz, B., Hernandez, P. E., 1997, "Métodos inmunológicos empleados para determinar el origen específico de la leche y derivados lácteos", *Alimentacion, Equipos y Tecnologia*, Julio/Agosto:53.
  - Hefle, S. L., 1995, "Immunoassay Fundamentals", *Food Technology*, February: 102.
  - Heimgartner, U.; Pietrzak, M.; Geertsen, R.; Brodelius, P.; Silva Figueiredo, A. C.; Pais, M. S., 1990, "Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*", *Phytochem.*, 29:1405.
  - Herrero-Martinez, J. M.; Simón-Alfonso, E. F.; Ramis-Ramos, G.; Gelfi, C.; Righetti, P. G., 2000, "Determination of cow's milk and ripening time in

---

nonbovine cheeses by capillary electrophoresis of the ethanol-water protein fraction”, *Electrophoresis*, 21:633.

- Hicks, C. L.; Onuorah, C.; O’Leary, J.; Langlois, G. E., 1986, “Effect of milk quality and low temperature storage on cheese yield-a summation, *J. Dairy Sci.*, 69:649.
- Huber, L., 1998, “Validation of analytical methods: review and strategy”, *LC, GC International*, fevereiro: 96.
- Hurley, I. P.; Coleman, R. C.; Ireland, H. E.; Williams, J. H. H., 2004a, “Measurement of Bovine IgG by Indirect Competitive ELISA as a Means of Detecting Milk Adulteration”, *J. Dairy Sci.*, 87:543.
- Hurley, I. P.; Ireland, H. E.; Coleman, R. C.; Williams, J. H. H., 2004b, “Application of immunological methods for the detection of species adulteration in dairy products”, *Int. J. Food Sci. & Technol.*, 39:873.
- Hynes, E.; Bach, C.; Lamberet, G.; Ogier, J. C.; Son, O.; Delacroix-Buchet, A., 2003, “Contribution of starter lactococci and adjunct lactobacilli to proteolysis, volatiles profiles and sensory characteristics of washed-curd cheese”, *Lait*, 83:31.
- IDF, 1984, “Update on existing analytical methods for detecting mixtures of cow’s, ewe’s and goat’s milk”, *International Dairy Federation*: 181, Brussels.
- IDF, 1987, “Sensory evaluation of dairy products”, *International Dairy Federation*: 99 A, Brussels.
- IFT, 1981, “Sensory Evaluation Guide For Testing Food and Beverage Products”, *Food Technol.*, Nov.: 50.
- Igoshi, K.; Kaminogawa, S.; Yamuchi, K., 1986, “Profiles of proteinase in Gouda-type cheese”, *J. Dairy Sci.*, 69:2018.

- 
- Irigoyen, A.; Izco, J. M.; Ibáñez, F. C.; Torre, P., 2000, "Evaluation of the effect of rennet type on casein proteolysis in an ovine milk cheese by means of capillary electrophoresis", *J. Chromatogr. A*, 881:59.
  - Izco, J. M.; Torre, P.; Barcina, Y., 1999, "Capillary electrophoresis: Evaluation of the effect of added enzymes on caseins proteolysis during the ripening of a ewe's-milk cheese", *Adv. Food Sci.*, 21:110.
  - James, C. S., 1995, "Principles of techniques used in food analysis", in Analytical chemistry of foods, Blackie Academic & Professional, UK.
  - Jandal, J. M., 1996, "Comparative aspects of goat and sheep milk", *Small Rum. Research*, 22:177.
  - Jenness, R., 1980, "Composition and characteristics of goat milk: Review 1968-1979", *J. Dairy Sci.*, 63:1605.
  - Jin, Y. K.; Park, Y. W., 1995, "Effects of aging time and temperature on proteolysis of commercial goat milk cheese produced in the United states", *J. Dairy Sci.*, 78:2598.
  - Kaminarides, S. E.; Anifantakis, E. M., 1993, "Comparative study of the separation of casein from bovine, ovine and caprine milks using HPLC", *J. Dairy Res.*, 60:495.
  - Kim Ha, J.; Lindsay, R. C., 1991, "Contribution of cow, sheep and goat milks to characterizing branched-chain fatty acid and phenolitic flavors in varietal cheeses", *J. Dairy Sci.*, 74:3267.
  - Kolar, C. W.; Mickle, J. B., 1963, "Relationship between milk fat acidity, short chain fatty acids and rancid flavor in milk", *J. Dairy Sci.*, 46:569.
  - Kosikowski, F. V., 1977, in Cheese and Fermented Milk Foods, 2nd ed., Edwards Bros., Ann Arbor, MI.

- 
- Krause, I.; Bockhardt, A.; Neckerman, H.; Henle, T.; Klostermeyer, H., 1995, "Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reverse-phase high performance liquid chromatography of dansyl derivatives", *J. Chromatogr. A*, 715:67.
  - Larrayoz, P.; Mendia, C.; Torre, P.; Barcina, Y.; Ordonez, I., 2002, "Sensory profile of flavour and odor characteristics in roncal cheese made from raw ewes milk", *J. Sensory Stu.*, 17:415.
  - Lawrence, R. C.; Creamer, L. K.; Gilles, J., 1987, "Texture Development During Cheese Ripening", *J. Dairy Sci.*, 70:1748.
  - Lecanu, L.; Ducret, V.; Jouquand, C.; Gratadoux, J. J.; Feigenbaum, A., 2002 "Optimization of headspace solid-phase microextraction (SPME) for the odor analysis of surface-ripening cheese", *J. Agric. Food Chem.*, 50:3810.
  - Lees, M., 2003, in Food authenticity and traceability, CRC Press, Boca Raton, USA.
  - Leveux, D.; Venien, A., 1994, "Rapid, Sensitive 2-Site Elisa for Detection of Cows Milk in Goats or Ewes Milk Using Monoclonal-Antibodies", *J. Dairy Res.*, 61: 91.
  - Liu, S. Q.; Holland, R.; Crow, V. L., 1998, "Ethyl butanoate formation by dairy lactic acid bacteria", *Int. Dairy J.*, 8:651.
  - Loewenstein, M.; Speck, S. J.; Barnhart, H. M.; Frank, J. H., 1980, "Research on goat milk products: A review", *J. Dairy Sci.*, 63:1631.
  - Mafra, I.; Ferreira, I. M. P. L. V. O.; Faria, M. A.; Oliveira, B. P. P., 2004, "A Novel Approach to the Quantification of Bovine Milk in Ovine Cheeses Using a Duplex Polymerase Chain Reaction Method", *J. Agric. Food Chem.*, 52: 4943.

- 
- Malcata, F. X.; Macedo, A. C., 1994, “Lacticínios tradicionais e inovações tecnológicas”, *Via Lactea*, nº5, Julho: 62.
  - Malin, E. L.; Brown, E. M., 1995, “Influence of casein peptide conformations on the textural properties of cheeses” in Chemistry of Structure-Function Relationships in Chees, E. L. Malin and M. H. Tunick, eds., Plenum Press, New York.
  - Martins, A. P. L.; Vasconcelos, M. M. P.; Rolo, M., 2000, “As denominações de origem protegidas de queijos portugueses – O mercado, o crescimento sectorial e as limitações estruturais e tecnológicas”, *Via Láctea*, 15, Janeiro: 25.
  - Mayer, W.; Hörtner, H., 1995, “Improved electrophoretic separation of  $\beta$ -caseins for the determination of bovine caseins in dairy products”, Proceedings of the Eight European Conference on Food Chemistry, 2:438.
  - Mayer, H. K.; Heidler, D.; Rockenbauer, C., 1999, “Detection of Cow’s, Ewe’s and Goat’s Milk Mixtures in Cheese Using Electrophoresis and HPLC of  $\gamma$ - and para- $\kappa$ -Caseins”, Fifth European Symposium on Food Authenticity, Atlantia-La Baule, France.
  - Mayer, H. K., 2005, “Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques”, *Int. Dairy J.*, 15:595.
  - McEwan, J. A.; Hunter, E. A.; van Gemert, L. J.; Lea, P., 2002, “Proficiency testing for sensory profile panels: measuring panel performance”, *Food Qual & Prefer*, 13:181.
  - McSweeney, P. L. H.; Sousa, M. J., 2000, “Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review”, *Lait*, 80:293.

- 
- Mendes, E.; Faria, M. A. P.; Ferreira, I. M. P. L. V. O., Ferreira, M., 1999, “Detecção da adulteração do leite e do queijo de ovelha com leite de vaca recorrendo à técnica de PCR (Reacção em Cadeia da Polimerase)”, 4º Encontro de Química dos Alimentos, Coimbra, Livro de Actas :395.
  - Michaelidou, A.; Alichanidis, E.; Urlaub, H.; Polychroniadou, A.; Zerfiri,dis, G. K., 1998, “Isolation and identification of some major water-soluble peptides in Feta cheese”, *J. Dairy Sci.*, 81:3109.
  - Miller, J. N., 1991, “Basic statistical methods for analytical chemistry. Part 2. Calibration and regression methods. A review”, *Analyst*, 116:3.
  - Molina, E.; Ramos, M.; Amigo, L., 2002, “Characterization of the casein fraction of Iberico cheese by electrophoretic techniques”, *J. Sci. food Agric.*, 82:1240.
  - Mulvihill, D. M.; Fox, P. F., 1989, “Physico-chemical and functional properties of milk proteins”, in Developments in dairy chemistry – 4, P. F. Fox (editor), Elsevier Applied Science, Londres.
  - Murray, J. M.; Delahunty, C. M.; Baxter, I. A., 2001, “Descriptive sensory analysis: past, present and future”, *Food Res. Int.*, 34:461.
  - Nelson, J. H.; Jensen, R. G.; Pitas, R. E., 1977, “Pregastric esterase and other oral lipases (A review)”, *J. Dairy Sci.*, 60:327.
  - Noomen, A., 1978, “Activity of proteolytic enzymes in simulated soft cheeses (Meschabger type). 1. Activity of milk proteases”, *Neth. Milk Dairy J.*, 32:26.
  - Norma Portuguesa NP EN ISO 707, Leite e produtos lácteos, linhas gerais para a amostragem 2001.

- 
- Ordóñez, J. A.; Burgos, J., 1977, "Etude de la variété de fromage «Ulloa». 1. Evolution de la flore microbienne et des composants azotés au cours de la maturation", *Lait*, 57:150.
  - O'Riordan, P. J.; Delahunty, C. M., 2003, "Characterisation of commercial Cheddar cheese flavour 2: Study of Cheddar cheese discrimination by composition, volatile compounds and descriptive flavour assessment", *Int. Dairy J.*, 13:371.
  - Park, Y. W., 2001, "Proteolysis and lipolysis of goat milk cheese", *J. Dairy Sci.*, 84 – E. Suppl :E84.
  - Partidário, A. M.; Calhau, L., 1999, "Estudo preliminar dos isómeros de ácidos gordos insaturados em queijo de S. Jorge". 4º Encontro de Química dos Alimentos, Coimbra, Livro de Actas :365.
  - Pestana, M. H.; Gageiro, J. N., 2003, in Análise de dados para ciências sociais. A complementaridade do SPSS, Cap. 4, Análise de variância, 3ª Edição, Edições Sílabo, Lisboa.
  - Pham, A.; Nakai, S., 1984, "Application of stepwise discriminant analysis to high-pressure liquid chromatography profiles of water extract for judging ripening of Cheddar cheese", *J. Dairy Sci.*, 67:1390.
  - Pietro, B.; Urdiales, R.; Franco, I.; Freco, J. M.; Carballo, J., 2000, "«Quesucos de Liébana» cheese from cow's milk: Biochemical changes during ripening", *Food Chem.*, 70:227.
  - Pinho, O.; Ferreira, I. M. P. L. V. O.; Mendes, E.; Oliveira, B. M.; Ferreira, M., 2001a, "Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine contents during storage of Azeitão cheese", *Food Chem.*, 75:287.

- 
- Pinho, O.; Ferreira, I. M. P. L. V.; Casal, S.; Fernandes, J. O.; Oliveira, M. B. P. P.; Ferreira, M. A., 2001b, "Method optimization for analysis of the volatile fraction of ewe cheese by solid-phase microextraction", *Chromatogr.*, 53 (Suppl) :S390.
  - Pinho, O.; Ferreira, I. M. P. L. V. O.; Ferreira, M. A., 2002, "Solid-phase microextraction in combination with GC/MS for quantification of the major volatile free fatty acids in ewe cheese", *Anal. Chem.*, 74:5199.
  - Pinho, O. M. C, 2003, "Implementação de metodologias analíticas com reduzido impacto ambiental para análise de queijo de ovelha. Contribuição na Caracterização do Queijo Terrincho", Dissertação de candidatura ao grau de doutor, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
  - Pinho, O.; Pérès, C.; Ferreira, I. M. P. L. V. O., 2003a, "Solid-phase microextraction of volatile compounds in «Terrincho» ewe cheese – Comparison of different fibers", *J. Chromatogr. A*, 1011:1.
  - Pinho, O.; Ferreira, I. M. P. L. V. O.; Ferreira, M. A., 2003b "Quantification of short-chain free fatty acids in «Terrincho» ewe cheese: intravarietal comparison", *J. Dairy Sci.*, 86:3102.
  - Pinho, O.; Pintado, A. I. E.; Gomes, A. M. P.; Pintado, M. M. E.; Malcata, F. X.; Ferreira, I. M. P. L. V. O., 2004a, "Interrelationships between microbiological, physiochemical and biochemical properties of Terrincho cheese, with emphasis on biogenic amines", *J. Food Protection*, 67, 11:2779.
  - Pinho, O., Ferreira, I. M. P. L. V. O.; Ferreira, M. A., 2004b, "Discriminate Analysis of the volatile fraction from Terrincho ewe cheese: Correlation with flavour characteristics", *Int. Dairy J.*, 14:455.

- 
- Pinho, O.; Mendes, E.; Alves, M. M.; Ferreira, I. M. P. L. V., 2004c, “Chemical, Physical and Sensorial Characteristics of «Terrincho» ewe cheese: Changes During Ripening and Intravarietal Comparison”, *J. Dairy Sci.*, 87, 1:1.
  - Plath, A.; Krause, I.; Einspanier, R., 1997, “Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques”, *Lebensm Unters Forsch A*, 205:437.
  - Poveda, J. M.; Cabezas, L.; McSweeney, P. L. H., 2004, “Free amino acid content of Manchego cheese manufactures with different starter cultures and changes throughout ripening”, *Food chem.*, 84:213.
  - Prazeres, P. M., 1995, “Cromatografia de proteínas em biotecnologia”, Soc. Portuguesa de Bioquímica, *Boletim de Biotecnologia*, 52:15.
  - Projecto de Norma Portuguesa prNp 4263, Análise Sensorial 1994.
  - Qian, M.; Reineccius, G., (2002), “Identification of aroma compounds in Parmigiano-Reggiano cheese by gas chromatography/ olfactometry”, *J. Dairy Sci.*, 85:1362.
  - Rank, T. C.; Grappin, R.; Olson, N. F., 1985, “Secondary proteolysis of cheese during ripening: a review”, *J. Dairy Sci.*, 68, 4:801.
  - Reference Method for the Detection of Cows` Milk and Caseinate in Cheeses from Ewes` Milk, Goats` Milk or Mixtures of Ewes`, Goats` and Buffalos` Milk. Official Journal of the European Communities n° L 37 de 07/02/2001, anexo XV, artículo 10:51.
  - Regulamento (CE) n° 1107/96 da Comissão de 12 de Julho de 1996 relativo ao registo das indicações geográficas e denominações de origem nos termos do procedimento previsto no artigo 17° do Regulamento (CEE) n°2081/92 do Conselho. Jornal Oficial n.° L 148 de 21/06/1996, p.0001.

- 
- Regulamento (CE) nº 2081/92 do Conselho, de 14 de Julho de 1992, relativo à protecção das indicações geográficas e denominação de origem dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial* n.º L 053 de 24/02/1998, p.0026.
  - Ritvanen, T.; Lampolahti, S.; Lilleberg, L.; Tupasela, T.; Isoniemi, M.; Appebye, U.; Lyytikäinen; Eerola, S.; Uusi-Rauva, E., 2005, "Sensory evaluation, chemical composition and consumer acceptance of full fat and reduced fat cheeses in the Finnish market", *Food Qual & Prefer*, 16:479.
  - Rodríguez, M. E. V., 1992, "Detección por técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) utilizando anticuerpos policlonales frente a caseínas de las leches de vaca, cabra y oveja en mezclas lácteas frescas y en quesos", Memoria para optar al grado de Doctor en Veterinaria, Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los alimentos), Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.
  - Sablé, S.; Cottenceu, G., 1999, "Current knowledge of soft cheeses flavour and related compounds", *J. Agric. Food Chem.*, 47:4825.
  - Saiki, R.; Gelfand, D.; Stoffel, H.; Sharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A., 1988, "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase", *Science*, 239:487.
  - Salino, L. 1994, "Novos queijos regionais com denominação de origem", *Via láctea*, nº5, Julho: 67.
  - Samples, D. R.; Richter, R. L.; Dill, C. W., 1984, "Measuring proteolysis in Cheddar cheese slurries: comparison of Hull and trinitrobenzene sulfonic acid procedures", *J. Dairy Sci.*, 67:60.

- 
- Santamaría, G.; Ramos, M.; Ordonez, J. A., 1986, "Application of linear-discriminant analysis to different proteolysis parameters for assessing the ripening of Manchego cheese", *Food Chem.*, 19:225.
  - Santos, M. V. M. Y.; Barbano, D. M., 2003, "Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage", *J. Dairy Sci.*, 86:2491.
  - Sørensen, J.; Benfeldt, C., 2001, "Compararison of ripening characteristics of Danbo cheeses from two dairies", *Int. Dairy J.*, 11:355.
  - Sousa, M. J.; Malcata, F. X., 1997, "Metodologia analítica para a monitorização da proteólise no queijo: princípios gerais e exemplos seleccionados", Soc. Portuguesa de Bioquímica, *Boletim de Biotecnologia*, 58:30.
  - Stone, H.; Sidel, J. L., 1993, in Sensory evaluation practices, (2<sup>nd</sup> ed.), London, Academic Press.
  - Strange, E. D.; Malin, E. L.; Hekken, D. L.; Basch, J. J., 1992, "Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins", *J. Chromatogr.*, 624: 81.
  - Sung, N.; Collins, M. T., 2000, "Effect of the factors in cheese production (pH, sal, and heat) on *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis viability", *Appl. Environ Microbiol.*, 66:1334.
  - Szczesniak, A. S., 1963, "Classification of textural characteristics", *J. Food Sci.*, 28: 385.
  - Thierry, A.; Maillard, M. B., 2002, "Production of cheese flavour compounds derived from amino acid catabolism by *Propionibacterium freudenreichii*", *Lait*, 82:17.

- 
- Thomas, T. D.; Pearce, K. N., 1981, "Influence of salt on lactose fermentation and proteolysis in Cheddar cheese", *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 16:253.
  - Trieu-Cout, P.; Gripon, J., 1982, "A study of proteolysis during Camembert cheese ripening using isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis", *J. Dairy Res.* 49: 501.
  - Torre, M.; Cohen, M. E.; Corzo, N.; Rodríguez, M. A.; Diez-Masa, J. C., 1996, "Perfusion liquid chromatography of whey proteins", *J. Chromatogr. A*, 729:99.
  - Trujillo, A. J.; Isidre, C.; Buenaventura, G., 2000, "Analysis of major ovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography and flow injection analysis with electrospray ionization mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 870: 371.
  - Urbanke, W.; Luf, W.; Brandl, E., 1992, "Einsatz der HPLC bei der Verfälschkontrolle von Milch und Milchprodukten verschiedener Species", *Lebensm Unters Forch*, 195:137.
  - Vallejo-Cordoba, B.; Mazorra-Manzano, M.; González-Córdova, A., 1998, "Determination of Short Chain Free Fatty Acids in Lipolyzed Milk Fat by Capillary Electrophoresis", *J. Capillary Electroph.*, 34:11.
  - Veloso, A. C. A., 2001, "Análise das Caseínas de Leite e Queijos por HPLC/UV e por Ureia-PAGE", Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Controlo de Qualidade em Alimentos. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
  - Veloso, A. C. A.; Teixeira, N.; Ferreira, I. M. P. L. V. O.; Ferreira, M. A., 2002a, "Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas", *Quim. Nova*, 25, 4:609.
  - Veloso, A. C. A.; Teixeira, N.; Ferreira, I. M. P. L. V. O., 2002b, "Separation and quantification of the major caseins fractions by reverse-phase high

---

performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis – Detection of milk adulterations”, *J. Chromatogr. A*, 967:209.

- Veloso, A. C. A.; Teixeira, N.; Peres, A. M.; Mendonça, A.; Ferreira, I. M. P. L. V. O., 2004, “Evaluation of cheese authenticity and proteolysis by HPLC and Urea PAGE”, *Food Chemistry*, 87:289.
- Visser, S., 1981, “Proteolytic enzymes and their action on milk proteins”, *Neth. Milk Dairy J.*, 35:65.
- Visser, S.; Slangen, K. J.; Rollema, H. S., 1986, “High-performance liquid chromatography of bovine caseins with the application of various stationary phases”, *Milchwissenschaft*, 41:559.
- Walstra, P.; Vliet, T. V., 1982, “Rheology of cheese”, *Int. Dairy Fed. Bull. Doc.* 153.
- Walstra, P., 1999, “Casein sub-micelles: do they exist?” *Int. Dairy J.*, 9:189.
- Wankat, P. C., 1990, in Rate-Controlled Separations, Elsevier Applied Science, London: 297.
- Wilhelmsen, E.; Philips, J. C.; Selinfreund, R. H., 1998, “Fingerptinting Foods” in Food Product, Weeks Publishing Company.

*Anexos*

**Anexo 1****COMPARAÇÃO ENTRE OS QUEIJOS A E B. TESTE T****QUEIJO TERRINCHO**

1ª semana

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
pico1	Equal variances assumed	5,838	,052	-1,696	6	,141	-30735,61	18126,498	-75089,5	13618,34
	Equal variances not assumed			-1,696	4,572	,156	-30735,61	18126,498	-78672,6	17201,42
2a	Equal variances assumed	,131	,730	-,949	6	,379	-6573,092	6927,1071	-23523,1	10376,93
	Equal variances not assumed			-,949	5,832	,380	-6573,092	6927,1071	-23641,8	10495,65
pico2	Equal variances assumed	,000	,996	-1,350	6	,226	-25058,20	18564,393	-70483,6	20367,23
	Equal variances not assumed			-1,350	5,995	,226	-25058,20	18564,393	-70493,1	20376,68
pico3	Equal variances assumed	,266	,624	-1,759	6	,129	-22954,31	13052,924	-54893,7	8985,043
	Equal variances not assumed			-1,759	5,989	,129	-22954,31	13052,924	-54908,1	8999,452
pico4	Equal variances assumed	,032	,865	-1,225	6	,266	-16918,83	13807,093	-50703,6	16865,91
	Equal variances not assumed			-1,225	5,977	,267	-16918,83	13807,093	-50735,1	16897,39
pico5	Equal variances assumed	4,942	,068	,504	6	,632	10903,606	21615,897	-41988,6	63795,80
	Equal variances not assumed			,504	3,117	,647	10903,606	21615,897	-56447,2	78254,36

2ª semana

## Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
								Lower	Upper	
pico1	,913	,376	-2,208	6	,069	-17915,57	8114,1026	-37770,1	1938,925	
Equal variances not assumed			-2,208	4,803	,081	-17915,57	8114,1026	-39032,8	3201,669	
2a	9,110	,023	1,008	6	,352	12954,512	12854,063	-18498,2	44407,27	
Equal variances not assumed			1,008	4,540	,364	12954,512	12854,063	-21119,9	47028,97	
pico2	1,078	,339	-3,186	6	,019	-18929,12	5941,5135	-33467,5	-4390,76	
Equal variances not assumed			-3,186	4,966	,025	-18929,12	5941,5135	-34234,2	-3624,02	
pico3	3,185	,125	-,837	6	,434	-25730,26	30726,389	-100915	49454,51	
Equal variances not assumed			-,837	3,677	,453	-25730,26	30726,389	-114078	62617,54	
pico4	,932	,372	-2,936	6	,026	-16737,40	5701,5493	-30688,6	-2786,21	
Equal variances not assumed			-2,936	5,141	,031	-16737,40	5701,5493	-31273,4	-2201,41	
pico5	5,291	,061	-,368	6	,725	-4903,092	13318,417	-37492,1	27685,90	
Equal variances not assumed			-,368	4,553	,729	-4903,092	13318,417	-40175,4	30369,18	

3ª semana

## Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
								Lower	Upper	
pico1	1,903	,217	Equal variances assumed	-1,047	6	,335	-39769,01	37967,591	-132672	53134,34
			Equal variances not assumed	-1,047	3,848	,356	-39769,01	37967,591	-146847	67309,04
2a	1,480	,270	Equal variances assumed	-1,435	6	,201	-89150,62	62129,964	-241177	62875,93
			Equal variances not assumed	-1,435	4,306	,220	-89150,62	62129,964	-256924	78622,80
pico2	3,389	,115	Equal variances assumed	-2,361	6	,056	-53273,87	22563,093	-108484	1936,032
			Equal variances not assumed	-2,361	3,324	,091	-53273,87	22563,093	-121274	14725,79
pico3	1,713	,238	Equal variances assumed	-2,116	6	,079	-57511,13	27174,913	-124006	8983,488
			Equal variances not assumed	-2,116	4,404	,095	-57511,13	27174,913	-130308	15285,59
pico4	,296	,606	Equal variances assumed	-1,212	6	,271	-13222,52	10908,634	-39915,0	13469,95
			Equal variances not assumed	-1,212	5,670	,274	-13222,52	10908,634	-40295,6	13850,53
pico5	1,887	,219	Equal variances assumed	-,125	6	,904	-8411,519	67192,566	-172826	156002,8
			Equal variances not assumed	-,125	4,076	,906	-8411,519	67192,566	-193603	176780,2

4ª semana

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
pico1	Equal variances assumed	5,365	,060	-1,167	6	,288	-25823,04	22134,437	-79984,1	28337,98
	Equal variances not assumed			-1,167	5,040	,296	-25823,04	22134,437	-82586,3	30940,20
2a	Equal variances assumed	,784	,410	-4,466	6	,657	-17648,77	37852,814	-110271	74973,73
	Equal variances not assumed			-4,466	5,914	,658	-17648,77	37852,814	-110598	75300,25
pico2	Equal variances assumed	5,713	,054	-2,028	6	,089	-21215,76	10463,236	-46818,4	4386,858
	Equal variances not assumed			-2,028	4,385	,106	-21215,76	10463,236	-49286,6	6855,133
pico3	Equal variances assumed	2,356	,176	,736	6	,489	31250,624	42435,866	-72586,2	135087,4
	Equal variances not assumed			,736	4,022	,502	31250,624	42435,866	-86322,0	148823,3
pico4	Equal variances assumed	,000	,996	-1,599	6	,161	-36658,93	22926,104	-92757,1	19439,22
	Equal variances not assumed			-1,599	5,996	,161	-36658,93	22926,104	-92766,3	19448,39
pico5	Equal variances assumed	1,507	,266	,608	6	,565	19064,596	31357,129	-57663,5	95792,73
	Equal variances not assumed			,608	4,017	,576	19064,596	31357,129	-67849,6	105978,8

## QUEIJOS DE MISTURA

Com 10% de vaca

1ª semana

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
1a	Equal variances assumed	224,322	,000	-1,343	6	,228	-51421,26	38286,433	-145105	42262,27
	Equal variances not assumed			-1,343	3,145	,268	-51421,26	38286,433	-170145	67302,22
1b	Equal variances assumed	14,102	,009	-1,931	6	,102	-17397,39	9009,1927	-39442,1	4647,310
	Equal variances not assumed			-1,931	3,869	,128	-17397,39	9009,1927	-42748,0	7953,234
2b	Equal variances assumed	4,459	,079	-3,489	6	,013	-157047,1	45008,635	-267179	-46915,0
	Equal variances not assumed			-3,489	3,268	,035	-157047,1	45008,635	-293861	-20233,3
3	Equal variances assumed	190,862	,000	,934	6	,386	52730,900	56432,781	-85355,1	190816,9
	Equal variances not assumed			,934	3,112	,417	52730,900	56432,781	-123265	228726,9
4	Equal variances assumed	185,054	,000	-,843	6	,432	-27281,32	32369,575	-106487	51924,17
	Equal variances not assumed			-,843	3,248	,457	-27281,32	32369,575	-125983	71420,69

2ª semana

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
1a	Equal variances assumed	,455	,525	1,470	6	,192	38036,341	25870,994	-25267,7	101340,4
	Equal variances not assumed			1,470	4,797	,204	38036,341	25870,994	-29323,7	105396,3
1b	Equal variances assumed	2,378	,174	-,791	6	,459	-13562,06	17147,455	-55520,4	28396,25
	Equal variances not assumed			-,791	4,215	,471	-13562,06	17147,455	-60228,1	33104,02
2a	Equal variances assumed	3,572	,108	-3,348	6	,015	-29800,86	8900,4403	-51579,5	-8022,27
	Equal variances not assumed			-3,348	4,097	,028	-29800,86	8900,4403	-54284,5	-5317,25
2b	Equal variances assumed	3,229	,122	,506	6	,631	47144,775	93263,176	-181062	275351,5
	Equal variances not assumed			,506	3,025	,648	47144,775	93263,176	-248288	342577,3
3	Equal variances assumed	2,633	,156	1,140	6	,298	42707,288	37477,873	-48997,8	134412,3
	Equal variances not assumed			1,140	4,975	,306	42707,288	37477,873	-53779,3	139193,9
4	Equal variances assumed	,117	,744	1,082	6	,321	30537,751	28227,725	-38533,0	99608,51
	Equal variances not assumed			1,082	5,999	,321	30537,751	28227,725	-38535,2	99610,74

3ª semana

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
1a	Equal variances assumed	4,601	,069	-1,419	7	,199	-33538,65	23630,286	-89415,4	22338,10
	Equal variances not assumed			-1,536	5,975	,176	-33538,65	21839,472	-87032,3	19954,99
1b	Equal variances assumed	,005	,945	-,290	7	,780	-2508,421	8659,8865	-22985,8	17968,96
	Equal variances not assumed			-,287	6,302	,783	-2508,421	8745,0254	-23660,4	18643,56
2a	Equal variances assumed	2,189	,182	-2,254	7	,059	-46137,18	20468,988	-94538,6	2264,289
	Equal variances not assumed			-2,074	4,033	,106	-46137,18	22241,243	-107693	15418,38
2b	Equal variances assumed	9,024	,020	-1,474	7	,184	-44940,18	30489,850	-117037	27156,85
	Equal variances not assumed			-1,325	3,471	,266	-44940,18	33904,820	-145009	55128,68
3	Equal variances assumed	9,321	,019	,923	7	,387	29977,818	32479,281	-46823,5	106779,1
	Equal variances not assumed			1,042	4,166	,354	29977,818	28761,797	-48637,1	108592,8
4	Equal variances assumed	12,935	,009	-1,198	7	,270	-39706,81	33144,811	-118082	38668,21
	Equal variances not assumed			-1,327	4,989	,242	-39706,81	29923,213	-116680	37266,45

4ª semana

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
1a	Equal variances assumed	,403	,549	-3,378	6	,015	-52553,57	15556,090	-90617,9	-14489,2
	Equal variances not assumed			-3,378	4,986	,020	-52553,57	15556,090	-92576,3	-12530,9
1b	Equal variances assumed	2,777	,147	-,791	6	,459	-25265,60	31926,051	-103386	52854,63
	Equal variances not assumed			-,791	4,929	,465	-25265,60	31926,051	-107691	57159,75
2a	Equal variances assumed	1,031	,349	-1,962	6	,097	-73995,22	37708,192	-166264	18273,40
	Equal variances not assumed			-1,962	5,515	,102	-73995,22	37708,192	-168265	20274,98
2b	Equal variances assumed	,820	,400	-1,167	6	,288	-81075,55	69502,351	-251142	88990,57
	Equal variances not assumed			-1,167	5,007	,296	-81075,55	69502,351	-259658	97507,35
3	Equal variances assumed	4,542	,077	-1,855	6	,113	-40590,41	21883,329	-94137,0	12956,17
	Equal variances not assumed			-1,855	3,296	,152	-40590,41	21883,329	-106823	25641,81
4	Equal variances assumed	9,536	,021	-,739	6	,488	-14653,23	19833,565	-63184,2	33877,75
	Equal variances not assumed			-,739	4,543	,496	-14653,23	19833,565	-67219,7	37913,23

## Com 20% de Vaca

## 1ª semana

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
1a	Equal variances assumed	16,008	,010	,327	5	,757	7278,9641	22243,657	-49900,2	64458,10
	Equal variances not assumed			,375	3,790	,728	7278,9641	19406,160	-47801,9	62359,85
1b	Equal variances assumed	3,071	,140	,797	5	,461	6580,3244	8251,8290	-14631,7	27792,33
	Equal variances not assumed			,937	3,163	,415	6580,3244	7021,0046	-15126,2	28286,89
2b	Equal variances assumed	,591	,477	-1,323	5	,243	-62435,86	47180,725	-183718	58846,06
	Equal variances not assumed			-1,238	3,317	,296	-62435,86	50415,821	-214535	89663,66
3	Equal variances assumed	,248	,639	1,814	5	,129	91056,793	50207,464	-38005,6	220119,2
	Equal variances not assumed			1,824	4,544	,134	91056,793	49923,114	-41242,3	223355,8
4	Equal variances assumed	,033	,863	-,403	5	,704	-12922,30	32073,694	-95370,4	69525,76
	Equal variances not assumed			-,394	4,056	,714	-12922,30	32827,475	-103568	77723,74

## 2ª semana

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
1a	Equal variances assumed	,063	,810	,811	6	,449	22403,707	27640,218	-45229,5	90036,88
	Equal variances not assumed			,811	4,988	,455	22403,707	27640,218	-48697,5	93504,87
1b	Equal variances assumed	,108	,754	-1,045	6	,336	-17093,74	16359,691	-57124,5	22936,98
	Equal variances not assumed			-1,045	5,563	,339	-17093,74	16359,691	-57899,3	23711,85
2a	Equal variances assumed	19,080	,005	-1,258	6	,255	-8909,7896	7084,7163	-26245,5	8425,8867
	Equal variances not assumed			-1,258	3,075	,296	-8909,7896	7084,7163	-31149,1	13329,48
2b	Equal variances assumed	2,033	,204	,328	6	,754	14210,841	43299,206	-91738,5	120160,2
	Equal variances not assumed			,328	5,643	,755	14210,841	43299,206	-93383,3	121805,0
3	Equal variances assumed	4,528	,077	,147	6	,888	7836,5628	53425,180	-122890	138563,3
	Equal variances not assumed			,147	5,024	,889	7836,5628	53425,180	-129300	144973,3
4	Equal variances assumed	1,217	,312	-,529	6	,616	-27879,25	52669,675	-156757	100998,8
	Equal variances not assumed			-,529	5,036	,619	-27879,25	52669,675	-162979	107220,1

## 3ª semana

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
1a	Equal variances assumed	3,223	,123	-1,455	6	,196	-18878,34	12970,704	-50616,5	12859,83
	Equal variances not assumed			-1,455	3,364	,232	-18878,34	12970,704	-57743,5	19986,78
1b	Equal variances assumed	3,813	,099	-2,881	6	,028	-64746,82	22475,275	-119742	-9751,80
	Equal variances not assumed			-2,881	5,178	,033	-64746,82	22475,275	-121930	-7563,69
2a	Equal variances assumed	169,552	,000	-1,587	6	,164	-58157,17	36640,612	-147814	31499,18
	Equal variances not assumed			-1,587	3,617	,195	-58157,17	36640,612	-164281	47966,83
2b	Equal variances assumed	2,713	,151	-5,034	6	,002	-119056,2	23650,040	-176926	-61186,7
	Equal variances not assumed			-5,034	3,430	,011	-119056,2	23650,040	-189258	-48854,3
3	Equal variances assumed	4,747	,072	,489	6	,642	19433,017	39700,489	-77710,6	116576,6
	Equal variances not assumed			,489	4,817	,646	19433,017	39700,489	-83800,4	122666,4
4	Equal variances assumed	5,038	,066	-1,210	6	,272	-15753,47	13019,361	-47610,7	16103,76
	Equal variances not assumed			-1,210	4,895	,281	-15753,47	13019,361	-49438,0	17931,02

## 4ª semana

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
1a	Equal variances assumed	1,396	,282	-1,148	6	,294	-16924,20	14736,274	-52982,6	19134,16
	Equal variances not assumed			-1,148	4,227	,312	-16924,20	14736,274	-56987,3	23138,86
1b	Equal variances assumed	,549	,487	1,591	6	,163	31992,427	20111,359	-17218,3	81203,15
	Equal variances not assumed			1,591	5,181	,171	31992,427	20111,359	-19168,3	83153,11
2a	Equal variances assumed	21,757	,003	-,260	6	,803	-15167,28	58305,124	-157835	127500,2
	Equal variances not assumed			-,260	3,580	,809	-15167,28	58305,124	-184821	154486,5
2b	Equal variances assumed	2,814	,144	-1,041	6	,338	-36813,70	35362,951	-123344	49716,33
	Equal variances not assumed			-1,041	3,469	,365	-36813,70	35362,951	-141222	67595,06
3	Equal variances assumed	,028	,872	-1,512	6	,181	-57062,36	37750,237	-149434	35309,14
	Equal variances not assumed			-1,512	5,999	,181	-57062,36	37750,237	-149436	35311,10
4	Equal variances assumed	1,701	,240	,056	6	,957	1541,9464	27617,384	-66035,4	69119,25
	Equal variances not assumed			,056	5,343	,958	1541,9464	27617,384	-68103,4	71187,27

## QUEIJO DE VACA

1ª semana

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
1a	Equal variances assumed	,299	,614	-1,260	4	,276	-15616,40	12392,805	-50024,3	18791,54
	Equal variances not assumed			-1,243	2,011	,339	-15616,40	12558,715	-69373,2	38140,37
1b	Equal variances assumed	4,793	,094	-0,16	4	,988	-176,9166	10996,366	-30707,7	30353,89
	Equal variances not assumed			-,022	3,879	,983	-176,9166	7926,8987	-22457,9	22104,09
2a	Equal variances assumed	48,933	,002	-,796	4	,471	-32198,85	40442,532	-144485	80087,82
	Equal variances not assumed			-,607	1,257	,635	-32198,85	53010,036	-453443	389045,3
2b	Equal variances assumed	21,645	,010	-,730	4	,506	-29030,97	39774,668	-139463	81401,21
	Equal variances not assumed			-1,080	3,187	,355	-29030,97	26868,474	-111774	53711,75
4	Equal variances assumed	,858	,407	-2,085	4	,105	-66388,79	31835,856	-154779	22001,72
	Equal variances not assumed			-1,740	1,436	,270	-66388,79	38157,232	-310968	178190,8

2ª semana

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
1a	Equal variances assumed	4,919	,057	-,103	8	,921	-1424,2485	13851,946	-33366,9	30518,40
	Equal variances not assumed			-,085	3,385	,937	-1424,2485	16785,611	-51565,0	48716,49
1b	Equal variances assumed	,071	,796	-,853	8	,419	-6241,7609	7319,5351	-23120,6	10637,12
	Equal variances not assumed			-,792	5,042	,464	-6241,7609	7877,7057	-26441,3	13957,77
2a	Equal variances assumed	4,286	,072	-,294	8	,777	-5472,9501	18643,734	-48465,5	37519,58
	Equal variances not assumed			-,240	3,304	,824	-5472,9501	22779,534	-74336,2	63390,33
2b	Equal variances assumed	,016	,901	-11,232	8	,000	-161965,5	14420,624	-195220	-128712
	Equal variances not assumed			-10,899	5,917	,000	-161965,5	14861,003	-198454	-125477
4	Equal variances assumed	7,744	,024	-4,789	8	,001	-114914,1	23993,259	-170243	-59585,5
	Equal variances not assumed			-3,969	3,428	,022	-114914,1	28952,581	-200878	-28950,1

## 3ª semana

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
1a	Equal variances assumed	3,708	,102	2,287	6	,062	19457,825	8507,6884	-1359,74	40275,39
	Equal variances not assumed			2,287	3,575	,092	19457,825	8507,6884	-5313,49	44229,14
1b	Equal variances assumed	1,802	,228	1,240	6	,261	18855,112	15200,999	-18340,4	56050,62
	Equal variances not assumed			1,240	4,350	,278	18855,112	15200,999	-22042,6	59752,82
2a	Equal variances assumed	5,567	,056	1,230	6	,265	53124,962	43187,281	-52550,5	158800,4
	Equal variances not assumed			1,230	3,102	,304	53124,962	43187,281	-81790,9	188040,8
2b	Equal variances assumed	2,642	,155	3,827	6	,009	66132,789	17282,373	23844,35	108421,2
	Equal variances not assumed			3,827	3,884	,020	66132,789	17282,373	17579,20	114686,4
4	Equal variances assumed	,598	,469	2,670	6	,037	94292,055	35313,052	7884,1308	180700,0
	Equal variances not assumed			2,670	4,687	,047	94292,055	35313,052	1664,3939	186919,7

## 4ª semana

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
1a	Equal variances assumed	,166	,698	-,605	6	,567	-4585,5360	7578,2216	-23128,8	13957,70
	Equal variances not assumed			-,605	5,760	,568	-4585,5360	7578,2216	-23317,4	14146,32
1b	Equal variances assumed	1,037	,348	-,278	6	,790	-4255,5217	15297,233	-41686,5	33175,46
	Equal variances not assumed			-,278	5,186	,792	-4255,5217	15297,233	-43157,7	34646,62
2a	Equal variances assumed	,030	,869	-,066	6	,950	-5147,5038	78446,805	-197100	186804,9
	Equal variances not assumed			-,066	5,997	,950	-5147,5038	78446,805	-197122	186826,9
2b	Equal variances assumed	,128	,733	-2,450	6	,050	-70427,23	28750,347	-140777	-77,6687
	Equal variances not assumed			-2,450	5,882	,051	-70427,23	28750,347	-141121	266,5819
4	Equal variances assumed	,247	,637	-4,406	6	,005	-89390,05	20286,192	-139029	-39751,5
	Equal variances not assumed			-4,406	5,467	,006	-89390,05	20286,192	-140225	-38554,9

**Anexo 2****EXPLORAÇÃO DOS DADOS****QUEIJO TERRINCHO****Tests of Normality**

Tempo maturação	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
pico1 7	,177	8	,200*	,883	8	,203
14	,182	8	,200*	,939	8	,602
21	,288	8	,049	,781	8	,018
30	,221	8	,200*	,900	8	,288
2a 7	,190	8	,200*	,876	8	,172
14	,319	8	,016	,809	8	,035
21	,276	8	,074	,852	8	,100
30	,276	8	,072	,835	8	,066
pico2 7	,201	8	,200*	,968	8	,881
14	,180	8	,200*	,960	8	,811
21	,262	8	,111	,833	8	,064
30	,272	8	,084	,911	8	,363
pico3 7	,144	8	,200*	,958	8	,789
14	,336	8	,008	,706	8	,003
21	,292	8	,044	,842	8	,080
30	,299	8	,034	,785	8	,020
pico4 7	,147	8	,200*	,954	8	,746
14	,148	8	,200*	,966	8	,865
21	,282	8	,060	,881	8	,194
30	,131	8	,200*	,985	8	,984
pico5 7	,252	8	,145	,907	8	,336
14	,232	8	,200*	,913	8	,379
21	,263	8	,111	,887	8	,221
30	,210	8	,200*	,931	8	,521

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

## Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
pico1	Based on Mean	1,673	3	28	,195
	Based on Median	1,139	3	28	,350
	Based on Median and with adjusted df	1,139	3	14,891	,365
	Based on trimmed mean	1,440	3	28	,252
2a	Based on Mean	4,598	3	28	,010
	Based on Median	4,130	3	28	,015
	Based on Median and with adjusted df	4,130	3	9,290	,041
	Based on trimmed mean	4,569	3	28	,010
pico2	Based on Mean	2,715	3	28	,064
	Based on Median	1,282	3	28	,300
	Based on Median and with adjusted df	1,282	3	12,820	,322
	Based on trimmed mean	2,446	3	28	,085
pico3	Based on Mean	,651	3	28	,589
	Based on Median	,355	3	28	,786
	Based on Median and with adjusted df	,355	3	20,540	,786
	Based on trimmed mean	,561	3	28	,645
pico4	Based on Mean	3,219	3	28	,038
	Based on Median	3,200	3	28	,039
	Based on Median and with adjusted df	3,200	3	17,990	,048
	Based on trimmed mean	3,223	3	28	,038
pico5	Based on Mean	5,697	3	28	,004
	Based on Median	2,311	3	28	,098
	Based on Median and with adjusted df	2,311	3	11,179	,132
	Based on trimmed mean	5,103	3	28	,006

**Anexo 3****RESULTADOS DA ANÁLISE DISCRIMINANTE****Eigenvalues**

Function	Eigenvalue	% of Variance	Cumulative %	Canonical Correlation
1	35,152 <sup>a</sup>	89,1	89,1	,986
2	3,415 <sup>a</sup>	8,7	97,8	,879
3	,872 <sup>a</sup>	2,2	100,0	,682

a. First 3 canonical discriminant functions were used in the analysis.

**Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients**

	Function		
	1	2	3
1	-1,052	,166	,599
2a	,797	-,179	-,150
2	,068	,596	-,846
5	,388	,643	,569

**ANEXO 4****EXPLORAÇÃO DOS DADOS DE ANÁLISE SENSORIAL****AVALIAÇÃO DA NORMALIDADE, SIMETRIA E CURTOSE PARA OS DIFERENTES ATRIBUTOS AVALIADOS.****Descriptives**

		Statistic	Std. Error	
orificios	Mean	3,90	,108	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3,68	
		Upper Bound	4,12	
	5% Trimmed Mean	3,89		
	Median	4,00		
	Variance	,702		
	Std. Deviation	,838		
	Minimum	3		
	Maximum	5		
	Range	2		
	Interquartile Range	2,00		
	Skewness	,193	,309	
	Kurtosis	-1,554	,608	

**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
orificios	,259	60	,000	,781	60	,000

a Lilliefors Significance Correction

**Descriptives**

		Statistic	Std. Error	
int do odor	Mean	4,27	,168	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3,93	
		Upper Bound	4,60	
	5% Trimmed Mean	4,24		
	Median	4,00		
	Variance	1,690		
	Std. Deviation	1,300		
	Minimum	2		
	Maximum	7		
	Range	5		
	Interquartile Range	2,00		
	Skewness	,248	,309	
	Kurtosis	-,453	,608	

## Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
int do odor	,180	60	,000	,919	60	,001

a Lilliefors Significance Correction

## Descriptives

		Statistic	Std. Error	
quald odor	Mean	4,47	,093	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	4,28	
		Upper Bound	4,65	
	5% Trimmed Mean	4,44		
	Median	4,00		
	Variance	,524		
	Std. Deviation	,724		
	Minimum	3		
	Maximum	6		
	Range	3		
	Interquartile Range	1,00		
	Skewness	,674	,309	
	Kurtosis	-,054	,608	

## Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
quald odor	,340	60	,000	,788	60	,000

a Lilliefors Significance Correction

## Descriptives

		Statistic	Std. Error	
int aroma	Mean	4,27	,154	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3,96	
		Upper Bound	4,57	
	5% Trimmed Mean	4,24		
	Median	4,00		
	Variance	1,419		
	Std. Deviation	1,191		
	Minimum	2		
	Maximum	7		
	Range	5		
	Interquartile Range	2,00		
	Skewness	,455	,309	
	Kurtosis	-,428	,608	

## Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
int aroma	,255	60	,000	,903	60	,000

a Lilliefors Significance Correction

## Descriptives

		Statistic	Std. Error	
qualid aroma	Mean	4,63	,132	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	4,37	
		Upper Bound	4,90	
	5% Trimmed Mean	4,65		
	Median	5,00		
	Variance	1,050		
	Std. Deviation	1,025		
	Minimum	2		
	Maximum	7		
	Range	5		
	Interquartile Range	1,00		
	Skewness	-,178	,309	
	Kurtosis	-,248	,608	

## Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
qualid aroma	,206	60	,000	,918	60	,001

a Lilliefors Significance Correction

## Descriptives

		Statistic	Std. Error	
qualid aroma	Mean	4,64	,122	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	4,39	
		Upper Bound	4,88	
	5% Trimmed Mean	4,65		
	Median	5,00		
	Variance	,867		
	Std. Deviation	,931		
	Minimum	3		
	Maximum	6		
	Range	3		
	Interquartile Range	1,00		
	Skewness	-,148	,314	
	Kurtosis	-,787	,618	

## Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
qualid aroma	,220	58	,000	,879	58	,000

a Lilliefors Significance Correction

## Descriptives

		Statistic	Std. Error
elasticidade	Mean	3,80	,113
	95% Confidence Interval for Mean	3,57	
	Lower Bound	4,03	
	Upper Bound		
	5% Trimmed Mean	3,83	
	Median	4,00	
	Variance	,773	
	Std. Deviation	,879	
	Minimum	2	
	Maximum	5	
	Range	3	
	Interquartile Range	1,00	
	Skewness	-,211	,309
	Kurtosis	-,695	,608

## Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
elasticidade	,223	60	,000	,868	60	,000

a Lilliefors Significance Correction

## Descriptives

		Statistic	Std. Error
adesividade	Mean	3,63	,119
	95% Confidence Interval for Mean	3,40	
	Lower Bound	3,87	
	Upper Bound		
	5% Trimmed Mean	3,61	
	Median	4,00	
	Variance	,846	
	Std. Deviation	,920	
	Minimum	2	
	Maximum	6	
	Range	4	
	Interquartile Range	1,00	
	Skewness	,268	,309
	Kurtosis	,249	,608

## Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
adesividade	,222	60	,000	,888	60	,000

a Lilliefors Significance Correction

## Descriptives

		Statistic	Std. Error	
fracturabili	Mean	3,83	,187	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3,46	
		Upper Bound	4,21	
	5% Trimmed Mean	3,78		
	Median	3,50		
	Variance	2,107		
	Std. Deviation	1,452		
	Minimum	2		
	Maximum	7		
	Range	5		
	Interquartile Range	2,00		
	Skewness	,438	,309	
	Kurtosis	-,876	,608	

## Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
fracturabili	,217	60	,000	,903	60	,000

a Lilliefors Significance Correction

## Descriptives

		Statistic	Std. Error	
DUREZA	Mean	3,00	,106	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2,79	
		Upper Bound	3,21	
	5% Trimmed Mean	2,94		
	Median	3,00		
	Variance	,678		
	Std. Deviation	,823		
	Minimum	2		
	Maximum	5		
	Range	3		
	Interquartile Range	1,00		
	Skewness	,754	,309	
	Kurtosis	,434	,608	

## Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DUREZA	,300	60	,000	,818	60	,000

a. Lilliefors Significance Correction

## ANÁLISE COMPONENTES PRINCIPAIS

## Model

Dimens	Cronbac Alph	Variance	
		Tot (Eigenval)	% of
1	.91	5.89	53.5
2	.42	1.62	14.7
Tot	.95 <sup>a</sup>	7.52	68.3

a. Total Cronbach's Alpha is Eigenval

## Correlations Transformed Variables

	orificios	int do odor	quald odor	int aroma	qualid aroma	ANIMAL	ÁCIDO	elasticidade	adesividade	fracturabili	DUREZA
orificios	1.000	.424	-.254	.430	.334	.367	.352	-.295	.418	.611	.392
int do odor	.424	1.000	-.038	.762	.761	.782	.807	-.554	.669	.794	-.303
quald odor	-.254	-.038	1.000	-.089	.137	-.004	-.009	-.099	-.063	-.265	-.091
int aroma	.430	.762	-.089	1.000	.693	.655	.761	-.555	.580	.820	-.187
qualid aroma	.334	.761	.137	.693	1.000	.688	.665	-.539	.563	.678	-.388
ANIMAL	.367	.782	-.004	.655	.688	1.000	.673	-.602	.397	.728	-.219
ÁCIDO	.352	.807	-.009	.761	.665	.673	1.000	-.559	.542	.710	-.205
elasticidade	-.295	-.554	-.099	-.555	-.539	-.602	-.559	1.000	-.185	-.566	.253
adesividade	.418	.669	-.063	.580	.563	.397	.542	-.185	1.000	.691	-.246
fracturabili	.611	.794	-.265	.820	.678	.728	.710	-.566	.691	1.000	-.081
DUREZA	.392	-.303	-.091	-.187	-.388	-.219	-.205	.253	-.246	-.081	1.000
Dimension	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Eigenvalue	5.893	1.626	.981	.800	.435	.379	.279	.248	.167	.123	.069

## Component

	Dimen	
	1	2
orifici	.53	.69
int do	.92	-
quald	-	-
int	.87	.04
qualid	.83	-
ANIM	.82	-
ÁCI	.85	-
elastici	-	.19
adesivi	.70	.07
fractur	.91	.26
DUR	-	.76

Variable Principal



## Errata

Página 43 – Onde se lê “SDS-PAGE” deve ler-se “Ureia-Page”.

Página 60 – Onde se lê “ $\alpha$ -lactoglobulina”, deve ler-se “ $\alpha$  lactalbumina”.

Página 103/ 119 – Onde se lê “ $\beta$ -caseína”, deve ler-se “ $\beta_1$ -caseína”.

Página 103 – Onde se lê, “respectivamente para a  $\alpha_{S2}$  e  $\alpha_{S1}$  caseínas”, deve ler-se “(...)  $\alpha_{S1}$  e  $\alpha_{S2}$  caseínas”.

Página 106 – Onde se lê “sobreposta à  $\beta_1$ -caseína (pico 3)”, deve ler-se “(...)  $\beta_2$ -caseína (pico 3)”

Página 111 – Onde se lê “nomeadamente a  $\alpha_{S2}$  caseínas ovina e bovina (pico 4)”, deve ler-se, “(...)  $\alpha_{S1}$  caseínas ovina e bovina (pico 4)”.