



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
CIÊNCIA DE ALIMENTOS



Área de Concentração: Ciência de Alimentos

**CARACTERIZAÇÃO DE COAGULANTE VEGETAL OBTIDO DA FLOR DA
ALCACHOFRA (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* L.) E SUA INFLUÊNCIA NA
PRODUÇÃO E MATURAÇÃO DO QUEIJO.**

Autor: Josane Cardim de Jesus

Orientadora: DSc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão

Co-orientadores: Prof. DSc. Leandro Soares Santos

Prof^a DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo

Itapetinga/2023

JOSANE CARDIM DE JESUS

**CARACTERIZAÇÃO DE COAGULANTE VEGETAL OBTIDO DA FLOR DA
ALCACHOFRA (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* L.) E SUA INFLUÊNCIA NA
PRODUÇÃO E MATURAÇÃO DO QUEIJO.**

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Sibelli Passini Barbosa Ferrão

Co-Orientador: Prof. Dr. Leandro Soares Santos

Co-Orientador: Profa. Dra. Renata Cristina Ferreira Bonomo

ITAPETINGA/2023

6 Jesus, Josane Cardim.
3 Caracterização de coagulante vegetal obtido da flor da alcachofra
7 (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* L.) e sua influência na produção e
3 . maturação do queijo. / Josane Cardim de Jesus. – Itapetinga-BA: UESB,
3 2023.

J 93f.

5

6 Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do Título de
c Doutora apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como
parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e
Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos. Sob
a orientação da Prof.^a D. Sc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão e coorientação
do Prof. D. Sc. Leandro Soares Santos e Prof.^a D. Sc. Renata Cristina
Ferreira Bonomo.

1. Alcachofra – Flor - Coagulante vegetal. 2. Queijos -
Produção - Coagulantes vegetais. 3. Alcachofra – Flor -
Coagulante vegetal - Caracterização. I. Universidade Estadual do
Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado
em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga.
II. Ferrão, Sibelli Passini Barbosa. III. Santos, Leandro Soares.
IV. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. V. Título.

CDD(21): 660.634

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Quimosina microbiana - Coagulante
2. Queijos - Processamento
3. *Cynara cardunculus*

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: "CARACTERIZAÇÃO DE COAGULANTE VEGETAL OBTIDO DA FLOR DA ALCACHOFA (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* L.) E SUA INFLUÊNCIA NA PRODUÇÃO E MATURAÇÃO DO QUEIJO"

Autor (a): JOSANE CARDIM DE JESUS

Orientador (a): Prof.º Dr.º Sibelli Passini Barbosa Ferrão

Coorientador (a): Prof. Dr. Leandro Soares Santos

Prof.º Dr.º Renata Cristina Ferreira Bonomo

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **DOUTORA EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.


Prof.º Dr.º Gabrielle Cardoso Reis Fontan

UESB


Prof. Dr. Danilo Junqueira Leão

UESB


Prof.º Dr.º Grazielly de Jesus Silva

UESB


Prof. Dr. Ben Hur Ramos Ferreira Gonçalves

UESB


Prof.º Dr.º Sibelli Passini Barbosa Ferrão
Orientadora - UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 24 de fevereiro de 2023.

AGRADECIMENTOS

A DEUS.

Aos meus pais.

Ao meu namorado.

À minha orientadora, professora Sibelli Passini.

*Ao professor Luis Teló da Gama por ceder gentilmente os pistilos de *Cynara Cardunculus*.*

Á Rejane pelo cuidado e carinho com flores da alcachofra.

A toda equipe do Grupo de Estudos em Leite (GEL).

Aos amigos.

Á Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da banca.

A todos aqueles que porventura não tenham sido citados, mas que com certeza contribuíram de forma significativa para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIACÕES	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
CAPÍTULO I: REFERENCIAL TEÓRICO	14
1- INTRODUÇÃO	15
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1. Queijo	17
2. Coagulação do leite	18
2.1. Coagulante de origem microbiana	20
2.2 Coagulantes de origem vegetal	22
2.2.1 Coagulante de <i>Cynara cardunculus</i>	23
2.2.2 Coagulante de <i>Cynara cardunculus L. var. scolymus</i>	26
3. Proteólise	29
3.1 Peptídeos bioativos com atividade antioxidante.....	31
3.2 Peptídeos bioativos com atividade antibacteriana	32
4. Estudos do perfil proteico do queijo: metodologias analíticas	33
5. Perfil sensorial de queijo	35
REFERÊNCIAS	38
CAPÍTULO II: Objetivos	47
1. OBJETIVOS	48
1.1 Objetivo Geral	48
1.2 Objetivos Específicos	48
CAPÍTULO III: Artigo I - Proteomic characterization of aspartic protease from artichoke flower (<i>Cynara cardunculus L. var scolymus</i>) using MIR spectroscopy and analytical measurements. .	49
Graphical Abstract (GA)	50
Abstract	52
Introduction	52
Experimental	53
Samples.....	53
Preparation of coagulant extracts.....	54
Determination of protein concentration.....	54
Determination of PA.....	54
Effect of pH, temperature, NaCl and CaCl ₂ concentration on PA.....	55
Determination of MCA.....	55
Effect of pH, temperature and NaCl and CaCl ₂ concentration on MCA.....	55
Determination of SR.....	56
Electrophoretic, spectroscopic and chromatographic characterization	56
Electrophoretic characterization	56

Spectroscopic characterization - MIR.....	56
Chromatographic Characterization	57
Storage stability	57
Experimental design	57
Results and Discussion	58
Characterization.....	58
Effects of pH, temperature and concentration of NaCl and CaCl ₂ on PA	59
Effects of pH, temperature and NaCl and CaCl ₂ concentration on MCA.	61
Electrophoretic, spectroscopic and chromatographic characterization	64
Electrophoresis.....	64
Spectroscopy	65
Chromatography.....	66
Assessment of storage stability.....	67
Conclusion.....	69
Acknowledgments	69
Author Contributions.....	70
References	70
<i>CAPÍTULO IV: Artigo II - Efeito do coagulante da flor da alcachofra (Cynara cardunculus L. var scolymus) nas propriedades analíticas, sensoriais e bioativas em queijo maturado.....</i>	73
Resumo	74
1. Introdução.....	74
2. Material e Métodos.....	76
2.1 Obtenção dos coagulantes do leite.....	76
2.2. Obtenção dos extratos vegetais.....	76
2.3. Processamento dos queijos	76
2.4 Efeito do coagulante durante a maturação do queijo.....	77
2.4.1 <i>Medidas analíticas</i>	77
2.5 Extração dos peptídeos solúveis em água (PSA).....	77
2.5.2 <i>Eletroforese</i>	78
2.5.3 <i>Perfil Cromatográfico</i>	78
2.6 Atividade antioxidante dos PSA	78
2.6.1 <i>Atividade de eliminação in vitro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)</i>	78
2.6.2 <i>Atividade antioxidante sistema β-caroteno-ácido linoleico</i>	79
2.6.3 <i>Atividade antioxidante redutor férrico (FRAP)</i>	79
2.7 Atividade antibacteriana dos PSA	79
2.8 Perfil Sensorial dos queijos	80
2.8.1 <i>Análises microbiológicas</i>	82
2.9 Planejamento Experimental	82
3. Resultados Discussão.....	82
3.1 Medidas analíticas	82
3.2 Eletroforese.....	84
3.3 Peptídeos bioativos	85
3.3.1 <i>Perfil cromatográfico dos PSA</i>	85
3.3.2 <i>Atividade antioxidante</i>	87
3.3.3 <i>Atividade antibacteriana</i>	88
3.4 Caracterização sensorial	89
4. Conclusão	91

Agradecimentos	91
5. Referências	91

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: REFENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 - Exemplos de coagulantes vegetais utilizados para a produção de queijos.22

CAPÍTULO III: Proteomic characterization of aspartic protease from artichoke flower (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*) using MIR spectroscopy and analytical measurements.

Table 1. Protein content, specific proteolytic activity, milk clotting activity and specificity ratio for artichoke, thistle and chymosin coagulants (mean \pm standard deviation).....58

CAPÍTULO IV: Efeito do coagulante da flor da alcachofra (*Cynara cardunculus* var *scolymus* L.) nas propriedades analíticas, sensoriais e bioativas em queijo maturado.

Tabela 1 - Termos descritores, definições e referências.80

Tabela 2 - Atividades antioxidantes dos PSA (média \pm desvio padrão) dos queijos produzidos com extrato da flor da alcachofra- T_A, extrato da flor do cardo-T_C e quimosina microbiana-T_Q com 1 dia de fabricação e com 10, 20 e 30 dias de maturação.87

Tabela 3 - Modelagem estatística do efeito do coagulante e d tempo de maturação sobre os atributos sensoriais dos queijos produzidos com extrato da flor da alcachofra- T_A, extrato da flor do cardo-T_C e quimosina microbiana-T_Q.89

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: REFENCIAL TEÓRICO

Figura 1 - Mecanismos de clivagem de κ -caseína durante a fase primária da coagulação do leite..	18
Figura 2 - Mecanismos da coagulação do leite durante a fase secundária.....	19
Figura 3 - <i>Cynara cardunculus</i> L.....	23
Figura 4 - <i>Cynara cardunculus</i> L. var <i>scolymus</i>	26
Figura 5 - Flor de alcachofra (<i>Cynara cardunculus</i> L. var. <i>scolymus</i>).	27
Figura 6 - Representação das etapas da proteólise no queijo.....	30

Proteomic characterization of aspartic protease from artichoke flower (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*) using MIR spectroscopy and analytical measurements.

Figure 1. Effect of pH (a), temperature (b) on proteolytic activity (U), fitted model and coefficient of determination (R^2). Experimental data (\blacktriangle \bullet \blacksquare) and model data (line).....	60
Figure 2. Effects of pH (a), temperature (b) and concentration of NaCl (c) and CaCl_2 (d) on MCA, fitted model and coefficient of determination (R^2). Experimental data (\blacktriangle \bullet \blacksquare) and model data (line).....	62
Figure 3. SDS-PAGE electrophoresis of crude artichoke flower extracts, thistle flower and microbial chymosin.....	64
Figure 4. Characterization of the crude artichoke flower extract, thistle flower extract and microbial chymosin by MIR.....	66
Figure 5. Chromatographic profiles obtained by molecular exclusion of the crude extracts of artichoke, thistle and microbial chymosin.	67
Figure 6. Evaluation of the proteolytic activity of artichoke flower crude extract, thistle flower extract and microbial chymosin during storage under freezing at 0, 30, 60, 90 and 120 days.	68

CAPÍTULO IV: Efeito do coagulante da flor da alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*) nas propriedades analíticas, sensoriais e bioativas em queijo maturado.

Figura 1- Dispersão das amostras de queijo produzidos com extrato da flor da alcachofra (T_A), extrato da flor do cardo (T_C) e quimosina microbiana (T_Q) com 1 dia de produzido e com 10, 20, e 30 dias de maturação. IEP- índice de extensão da proteólise; IPP- índice de profundidade da proteólise.....	83
Figura 2 - Gel de SDS-PAGE representativo dos queijos produzidos com diferentes coagulantes: a) com 1 dia de produção e 10 dias de maturação; b) 20 e 30 dias de maturação. M- Marcador de peso molecular; T_A - queijo produzido com extrato da alcachofra; T_C – queijo produzido com extrato do cardo e T_Q – queijo produzido com quimosina microbiana.....	84
Figura 3 – Cromatogramas dos PSA dos queijos produzidos com extrato da flor da alcachofra - T_A , extrato da flor do cardo - T_C e quimosina microbiana - T_Q . a) com 1 dia de produção e 10 dias de maturação; (b) 20 e 30 dias de maturação.....	85
Figura 4 - Mapa sensorial descritivo obtido por Análise de Componentes Principais dos queijos produzidos com extrato da flor da alcachofra - T_A , extrato da flor do cardo - T_C e quimosina microbiana - T_Q , com 10, 20 e 30 dias de maturação.	90

LISTA DE ABREVIações

AP – Atividade proteolítica

CIM - Concentração Inibitória Mínima

EC₅₀ - Concentração necessária mg.mL⁻¹ sequestrar 50% do radical DPPH

DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilil

FRAP – Capacidade de redução do ferro

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

IEP – Índice de Extensão da Proteólise

IPP – Índice de Profundidade da Proteólise

MCA – Milk Clotting Activity/ Atividade de Coagulação

MIR – Infravermelho Médio

PDO – Perfil Descritivo Otimizado

PSA – Peptídeos Solúveis em Água

R – Razão de Especificidade

T_A – Queijo produzido com extrato das flores da alcachofra

T_C – Queijo produzido com extrato das flores do cardo

T_Q – Queijo produzido com quimosina microbiana

TCA – Ácido Tricloroacético

JESUS, J. C. **Caracterização de coagulante vegetal obtido da flor da alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) e sua influência na produção e maturação do queijo.** Itapetinga – BA: UESB, 2023. 93p. (Tese – Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos).*

RESUMO

A quimosina é o coagulante mais utilizado na produção de queijos, a oferta desse coalho se tornou menos conveniente, principalmente devido ao alto custo de produção e coagulantes vegetais têm chamado a atenção devido às mudanças de hábitos dos consumidores. A fim de avaliar uma fonte alternativa à quimosina, objetivou-se caracterizar o coagulante vegetal obtido da flor da alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *Scolymus*) e sua influência na produção e maturação do queijo. Foram utilizados em três repetições o extrato da flor da alcachofra, e como referências o extrato da flor do cardo e quimosina microbiana. Os coagulantes foram caracterizados quanto à concentração de proteína, atividade proteolítica (AP), atividade de coagulação (MCA), razão de especificidade (R), efeitos do pH, temperatura, concentração de CaCl_2 e NaCl na AP e MCA, caracterização por eletroforese (SDS-PAGE), Infravermelho Médio (MIR), cromatografia por exclusão molecular e estabilidade ao armazenamento por 0, 30, 60, 90 e 120 dias sob congelamento. Foram produzidos queijos com leite bovino e coagulado com extrato da flor da alcachofra (T_A), extrato da flor do cardo (T_C) e quimosina microbiana (T_Q), em três repetições cada. Os queijos foram analisados com 1 dia de fabricação e nos tempos de maturação 10, 20 e 30 dias, quanto aos percentuais de umidade, Resíduo Mineral Fixo (RMF), cloretos, Gordura no Extrato Seco (GES), Nitrogênio Total (NT), pH, acidez titulável, Análise do Perfil de Textura (TPA), Índice de Extensão da Proteólise (IEP), Índice de Profundidade da Proteólise (IPP), SDS-PAGE e caracterização sensorial por meio do Perfil Descritivo Otimizado (PDO). A partir dos peptídeos gerados durante a maturação, foram realizadas análises por RP-HPLC, atividade antioxidante (DPPH, β -caroteno e FRAP) e atividade antibacteriana. Para os dados da caracterização dos coagulantes foi realizada uma Regressão Fatorial e para os queijos produzidos Análise de Componentes Principais (ACP). Os resultados indicaram que T_A apresentou alto MCA ($510,08 \text{ SU mL}^{-1}$) quando comparado com T_C e T_Q , baixo AP ($10,50 \mu\text{g mg}^{-1}$) e estabilidade ao armazenamento sob congelamento. Na ACP, os queijos foram separados pelo tempo de maturação independente do tipo de coagulante. Os peptídeos gerados durante a maturação mostraram que as reações que ocorreram em T_A geraram peptídeos com atividade antioxidante e antibacteriana. Na ACP do PDO, o queijo T_A foi caracterizado com gosto amargo, sabor de folhas e textura pastosa. O extrato da flor da alcachofra pode ser uma boa alternativa de proteases vegetais na produção de queijos.

PALAVRAS CHAVES: extrato vegetal, hidrólise, proteinases, quimosina.

ESUS, J. C. **Characterization of vegetable coagulant obtained from artichoke flower (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) and its influence on cheese production and maturation.** Itapetinga – BA: UESB, 2023. 71p. (Thesis – Doctorate in Engineering and Food Science).

ABSTRACT

Chymosin is the most used coagulant in cheese production, but vegetable coagulants have drawn attention due to changes in consumer habits. In order to evaluate an alternative source to chymosin, the objective was to characterize the vegetable coagulant obtained from the artichoke flower (*Cynara cardunculus* L. var. *Scolymus*) and its influence on cheese production and maturation. The extract of the artichoke flower was used in three repetitions, and as references the extract of the thistle flower and microbial chymosin. The coagulants were characterized in terms of protein concentration, proteolytic activity (PA), coagulation activity (MCA), specificity ratio (R), effects of pH, temperature, concentration of CaCl₂ and NaCl in PA and MCA, characterization by electrophoresis (SDS-PAGE), Middle Infrared (MIR), size exclusion chromatography and storage stability for 0, 30, 60, 90 and 120 days under freezing. Cheeses were produced with bovine milk and coagulated with artichoke flower extract (T_A), thistle flower extract (T_C) and microbial chymosin (T_Q), in three replications each. The cheeses were analyzed after 1 day of manufacture and at maturation times of 10, 20 and 30 days, regarding moisture percentage, Fixed Mineral Residue (FMR), chlorides, Fat in Dry Extract (FDE), Total Nitrogen (TN), pH, titratable acidity, Texture Profile Analysis (TPA), Proteolysis Extent Index (PEI), Proteolysis Depth Index (PDI), SDS-PAGE and sensorial characterization through the Optimized Descriptive Profile (ODP). From the peptides generated during maturation, analyzes were carried out by RP-HPLC, SDS-PAGE, antioxidant activity (DPPH, β-carotene and FRAP) and antibacterial activity. For the characterization data of the coagulants, a Factorial Regression was performed and for the cheeses produced, Principal Component Analysis (PCA). The results indicated that T_A presented high MCA (510.08 SU mL⁻¹) when compared to T_C and T_Q, low PA (10.50 μg mg⁻¹) and stability to storage under freezing. In the PCA, the cheeses were separated by maturation time, regardless of the type of coagulant. The peptides generated during maturation showed that the reactions that occurred in T_A generated peptides with antioxidant and antibacterial activity. In the PCA of the ODP, the T_A cheese was characterized with a bitter taste, leaf flavor and pasty texture. Artichoke flower extract can be a good alternative to plant proteases in cheese production.

KEYWORDS: plant extract, hydrolysis, proteinases, chymosin.

CAPÍTULO I: REFERENCIAL TEÓRICO

1- INTRODUÇÃO

A coagulação do leite é uma das etapas mais importantes na fabricação do queijo, envolvendo modificações da micela de caseína pela ação de proteínas específicas, resultando na sua agregação na presença de cálcio. Durante muito tempo o coalho de origem animal foi o coagulante mais utilizado na fabricação da maioria das variedades de queijos. Apresenta como principal agente coagulante a protease quimosina, que hidrolisa a κ -caseína, localizada principalmente na superfície da micela da caseína. Porém, a oferta desse coagulante se tornou menos conveniente, principalmente devido ao alto custo desse produto e às considerações éticas e questões religiosas associadas ao seu uso.

Esses fatos incentivaram a busca por novas alternativas de coagulantes do leite, como os de origem microbiana. Esses coagulantes apresentam características muito semelhantes aos de origem animal e por serem obtidos através de fermentação ou engenharia genética (fermentação com micro-organismos geneticamente modificados) podem fornecer quantidade quase ilimitada de coagulante (quimosina microbiana) com características semelhantes à quimosina animal.

Tem-se conhecimento que a quimosina microbiana é um excelente substituto da quimosina bovina, no entanto, proteases provenientes de plantas têm chamado a atenção devido à abundância de recursos vegetais, conveniência de extração, além de conferir características sensoriais diferenciadas ao queijo que são apreciadas pelos consumidores. Essas características têm motivado pesquisadores a encontrarem novas fontes enzimáticas vegetais com potencial de aplicação na coagulação do leite, de maneira a substituir satisfatoriamente os coalhos tradicionalmente utilizados na produção de queijos (BEY et al., 2018; GOSTIN e WAISUNDARA, 2019; DE FARIAS et al., 2020)

As proteases obtidas de partes de plantas, como caule, flores e frutos, ou até mesmo de secreções de látex, apresentam atividades de coagulação do leite e tem sido bastante estudadas como látex de *Jacaratia corumbensis* (ARRUDA et al., 2012), fruto do Kiwi (*Actinidiana* L.) (MAZORRA-MANZANO et al., 2013), caules e folhas do funcho (*Foeniculum vulgare*) (BEY et al., 2018), fruto do Noni (*Morinda citrifolia* L.) (DE FARIAS et al., 2020), batata (*Solanum tuberosum*) (TITO et al., 2020) e flor do cardo (*Cynara cardunculus*) (ALAVI e MOMEN, 2020).

As espécies do gênero *Cynara* como as flores do cardo são exemplos de fontes vegetais de proteases que são utilizadas há séculos na Península Ibérica para produção de algumas variedades de queijos artesanais de textura cremosa, macia e de sabor único, além disso, os queijos produzidos a partir de extratos vegetais são considerados fontes ricas de compostos biologicamente ativos como os peptídeos bioativos, que são gerados em uma maior quantidade, principalmente quando são submetidos ao processo de maturação.

A alcachofra é cultivada como alimento e pode ser considerada uma das culturas vegetais mais importantes na Bacia do Mediterrâneo. Nessa região são cultivadas tradicionalmente, porém seu plantio se difundiu mundialmente, chegando a países da América Latina como o Brasil (RICCERI; BARBAGALLO, 2016). O estado de São Paulo é responsável por mais de 80% do total de alcachofra produzida no país. De acordo com Instituto de Economia Agrícola (IEA-APTA), em 2019, a produção de flores de alcachofra no estado de São Paulo atingiu a marca de 4,32 milhões (IEA-APTA, 2023).

As flores da alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) são usadas como alimento, cujas inflorescências (“cabeça”) comestíveis, conhecidas por seu gosto doce e amargo, são uma fonte rica de inulina, fibras, minerais e constituintes antioxidantes, como a vitamina C e compostos fenólicos, podendo ser consumidas frescas ou processadas. Além disso, partes da inflorescência, ou até mesmo folhas e raízes, podem ser utilizadas como agente de coagulação do leite na produção de queijos por possuírem em sua composição proteases ativas sob a caseína do leite (ALAVI; MOMEN, 2020; GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011).

Nesse estudo, foi utilizado o extrato bruto da *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* como alternativa à quimosina microbiana devido ao seu potencial de coagulação do leite. Apesar de alguns estudos já terem sido realizados utilizando a flor da alcachofra como coagulante do leite, esses estudos fornecem poucas informações sobre as características sensoriais e proteômicas do queijo durante a maturação.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Queijo

O queijo é definido como o produto obtido a partir do leite integral, padronizado ou desnatado, coagulado por meio de enzimas específicas, ou por acidificação e aquecimento, podendo ser maturado ou não (BRASIL, 1996). Há relatos que foi o primeiro derivado lácteo produzido no Brasil, que teve início com a colonização portuguesa logo nos primeiros anos do Brasil Colônia. As primeiras indústrias processadoras de leite foram direcionadas à produção de queijos, na qual fabricavam principalmente queijos não maturados ou de maturação curta, como os queijos Minas Frescal e Minas Padrão, respectivamente (CRUZ et al., 2017).

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (ABIQ), o consumo de queijo tem crescido no país. Estima-se que em 2009 cada brasileiro consumia, em média, 2,17kg de queijo/habitante/ano, e em 2017 em torno de 5,4kg/habitante/ano, o que indica um aumento significativo, embora ainda abaixo do recomendado pela FAO que é de 9,0 kg/habitante/ano. Estima-se que até 2030 o consumo chegue a atingir a marca de 9,6kg de queijo por habitante/ano. O Brasil é um país com potencial de crescimento no consumo de queijos, principalmente em função da demanda por queijos importados, além dos queijos tipicamente brasileiros, como os queijos Minas Artesanal, Minas Padrão, Queijo Coalho e Queijo Prato (ABIQ, 2021; SCOTCONSULTORIA, 2021).

Os queijos representam grande parte do mercado nacional de lácteos, estima-se que entre 2019 e 2020, foram produzidos no Brasil um volume de 1,2 milhão de toneladas de queijo (ABRAS, 2023).

A produção do queijo possui tecnologia bastante diversificada, podendo variar em função da utilização de diferentes tipos de leite na fabricação (bovino, caprino, ovino, bubalino, entre outros), forma de coagulação (enzimática, acidificação ou térmica), origem do coagulante (animal, microbiana ou vegetal) adição de culturas lácticas (bactérias ou fungos) e tempo de maturação (semanas ou até anos) (CIPOLAT-GOTET et al., 2018).

A produção de queijos é basicamente um processo de concentração do leite no qual os seus principais componentes sólidos insolúveis, proteína e gordura são concentrados na coalhada enquanto as proteínas solúveis e parte da lactose são perdidas no soro (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009). Assim, os queijos são compostos principalmente de caseína, gordura, água e minerais (principalmente cálcio e fósforo). A maior parte da estrutura do queijo é atribuída à matriz de caseína que fornece a dureza, enquanto a água e os glóbulos de gordura lhe conferem maciez (TRAN DO e KONG, 2018).

As micelas de caseína podem ser desestabilizadas por inúmeros fatores, um deles é quando a

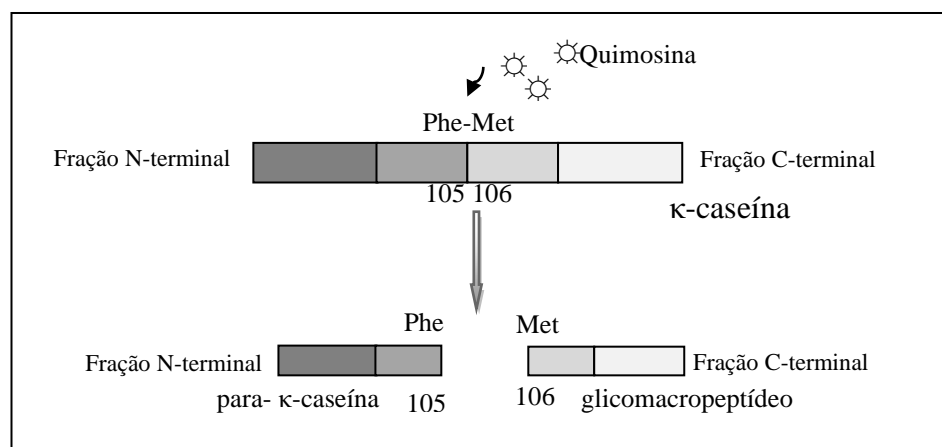
κ -caseína é hidrolisada por proteases específicas usualmente denominadas de coalho ou ao coagulante. O coalho é o extrato obtido do abomaso de animais ruminantes, já o coagulante é o termo aplicado a qualquer preparação enzimática bruta de origem vegetal ou microbiana que são compostos dessas proteases com capacidade de coagular o leite de diferentes espécies e são utilizados na produção de aproximadamente 75% de diferentes variedades de queijos e desempenham um papel importante durante a maturação (EL-TANBOLY et al., 2013; AHMED et al., 2016). A coagulação é a base para a transformação do leite em queijo e compreender o mecanismo desse processo é importante na otimização dos efeitos da enzima coagulante sob a κ -caseína (CALLAGHAN-PATRACHAR et al., 2021).

2. Coagulação do leite

A coagulação do leite é uma etapa importante na fabricação de queijos. Tradicionalmente o coagulante utilizado na produção da maioria dos queijos é obtido a partir do abomaso de bezerros jovens abatidos e é constituído principalmente de quimosina (EC 3.4.23.4), componente principal, e pepsina (EC 3.4.23.1). De acordo com Mazorra-Manzano et al. (2013), no estômago de bezerros jovens a quimosina apresenta-se em maior concentração (cerca de 80-90%) que a pepsina (10-20%), enquanto a quimosina extraída do estômago de bovinos adultos tende a desaparecer à medida que a pepsina aumenta sua concentração.

A quimosina, uma protease aspártica, também conhecida como protease ácida, ativa em pH ácido, é considerada o melhor coagulante devido à sua alta especificidade em clivar a κ -caseína em duas frações entre os aminoácidos fenilalanina (105) e metionina (106). A fração N-terminal composta pelos aminoácidos 1 a 105 da κ -caseína é chamada de para- κ -caseína (Figura 1) (ORDÓÑEZ, 2005; CRUZ et al., 2017).

Figura 1 - Mecanismos de clivagem de κ -caseína durante a fase primária da coagulação do leite.

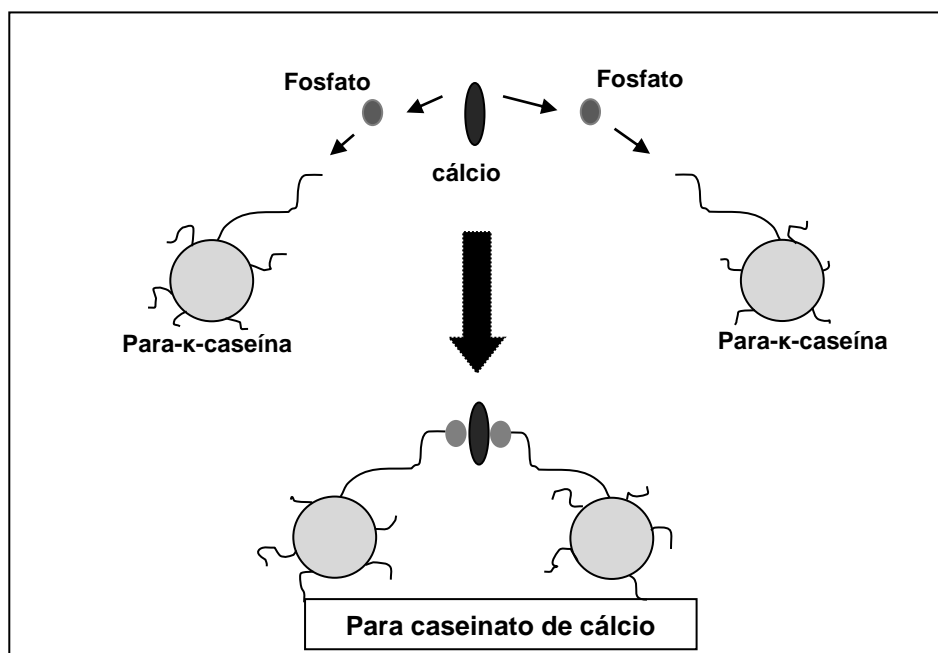


Fonte: Próprio autor.

A região central da molécula da para- κ -caseína é altamente hidrofóbica, e com a liberação dos fragmentos do caseinomacropéptido composto pelos aminoácidos de 106 a 169 da fração C-terminal, ocorre a redução do potencial zeta das micelas de caseína de -20 mV para cerca de -10 mV, potencial que atua na estabilidade da dispersão, determinando as forças intermoleculares, e devido a isso ocorre a diminuição das forças repulsivas permitindo que as micelas de para- κ -caseína fiquem mais próximas (BRITTEN e GIROUX, 2022).

Após essa primeira hidrólise da micela de caseína, ou seja, fase primária da coagulação, as modificações físico-químicas continuam e na fase secundária ocorre a agregação e geleificação das micelas. Quando a hidrólise da κ -caseína atinge valores entre 80% a 90%, as micelas começam a se agregar, por meio de interações hidrofóbicas e pontes de cálcio (interações iônicas), formando uma rede proteica (Figura 2) (ORDÓÑEZ, 2005; LIU et al., 2021).

Figura 2 - Mecanismos da coagulação do leite durante a fase secundária.



Fonte: Próprio autor.

Alguns fatores como origem do coagulante, temperatura, concentração de cálcio iônico e pH do leite podem influenciar na formação da coalhada, ou seja, na ação do coalho sob a caseína. Em temperaturas abaixo de 18°C a coagulação ocorre lentamente, porém, ao se elevar essa temperatura para 40°C a formação da coalhada melhora. A altas temperaturas ($>60^{\circ}\text{C}$) ocorre a desnaturação das proteínas do soro, formando um complexo de κ -caseína com β -Lactoglobulina e α -Lactalbumina, o que diminuiu a concentração efetiva de κ -caseína aumentando tempo de formação da coalhada (BEY

et al., 2018; LUO et al., 2018).

O cálcio iônico e o fosfato de cálcio são essenciais para a agregação e gelificação das micelas de caseína. A adição do cálcio acelera a coagulação do leite e aumenta a firmeza do gel. Em concentrações suficientes, ajuda a coagulação criando condições isoelétricas e agindo como uma ponte entre as micelas de caseína. Ele interage com os aminoácidos carregados negativamente, neutralizando-os, reduzindo as repulsões eletrostáticas. Além disso, a formação de pontes de cálcio entre os sítios negativos ajuda a aumentar a taxa de endurecimento do gel. O aumento da concentração de cálcio iônico leva a um aumento na taxa de coagulação (LIU et al., 2018).

A diminuição do pH reduz as cargas nas micelas de caseína e aumenta a concentração de cálcio iônico ao solubilizar o fosfato de cálcio coloidal, o que prejudica a estabilidade das micelas e promove sua agregação. De acordo com Bey et al. (2018), o pH ideal para a ação do coalho é cerca de 5,3–5,5 levando à acidificação do leite e diminuindo a estabilidade das micelas de caseínas devido a neutralização de suas cargas negativas.

Britten e Giroux (2022) afirmam que em pH 5,5 as micelas de caseína tendem a se aproximar devido à redução de seu potencial zeta, que é um indicador das interações entre partículas, atuando na estabilidade das partículas em solução. Indica o potencial necessário para que ocorra o rompimento da película protetora de íons que rodeiam a partícula em solução. Desse modo, ocorre o aumento do potencial zeta para zero e diminuindo as forças repulsivas. Em pH 6,8, a β -Lactoglobulina torna-se associada à κ -caseína por pontes dissulfeto, já em $\text{pH} > 8$, as estruturas das micelas de caseína encontram-se dissociadas.

Após o processo de coagulação, o coágulo sofre transformações (corte e agitação) de acordo com o tipo de queijo que se deseja obter. Esses diferentes tratamentos levam à produção dos vários tipos de queijos que se encontram no mercado (ALVES et al., 2013; MAZORRA-MANZANO et al., 2013; CRUZ et al., 2017).

2.1. Coagulante de origem microbiana

O coalho bovino empregado na produção de queijo tornou-se progressivamente escasso à medida que a produção de queijo aumentou, houve redução do abate de bezerras, além dos preços cada vez mais elevados deste coagulante. Nesse sentido, houve a necessidade de um substituto adequado do coalho bovino para a produção de queijos. Esses substitutos devem reproduzir suas propriedades específicas, isto é, devem apresentar alta atividade de coagulação do leite, que consiste em ter especificidade para a κ -caseína e baixa atividade proteolítica nos valores de pH e temperatura normalmente usados na fabricação de queijos (AHMED et al., 2016).

O uso de coagulantes de origem bacteriana e fúngica se difundiu mundialmente e sua produção através da fermentação. Após o processo fermentativo e consequente produção de enzima,

é feita a extração da quimosina. (MAZORRA-MANZANO et al., 2013).

Os coagulantes de origem microbiana ganharam destaque em sua produção por apresentarem alta estabilidade, disponibilidade, baixo custo devido à possibilidade de utilizar substratos baratos para fermentação, maior diversidade bioquímica, modificação genética mais fácil, além de oferecer uma variedade de propriedades que permitem a seleção mais adequada na produção de queijo (AHMED et al., 2016).

Esses coagulantes, assim como a quimosina bovina, possuem proteases aspárticas derivadas de inúmeras fontes fúngicas ou bacterianas, como *Rhizomucor Pusillus*, *Rhizomucor Miehei*, *Endotenia Parasitica*, *Aspergillus Oryzae* e *Irpex Lactis*, e que apresentam uma especificidade comparável à quimosina bovina, mas com maior estabilidade térmica. Outro tipo de quimosina que pode ser obtida é a quimosina recombinante, que é uma preparação enzimática obtida de microorganismos geneticamente modificados, tais como *Aspergillus nigger*, *Kluyveromyces lactis* e *Escherichia coli*, portadores do gene da quimosina de vitelo, sendo os mais difundidos no mercado (FEIJOO-SIOTA et al., 2018).

Muitas pesquisas foram realizadas a fim de encontrar proteases de origem microbiana que possam substituir o coalho animal. Lemes et al. (2016) estudaram a enzima de coagulação do leite produzida por *Bacillus* sp. P45 aplicado no desenvolvimento de cream cheese, tendo como objetivo investigar sua aplicação como uma nova protease de coagulação do leite no desenvolvimento de cream cheese enriquecido com chia e farinha de quinoa, e concluíram que as características tecnológicas do produto final indicaram que a nova fonte enzimática era altamente estável e viável.

Ahmed et al. (2016) estudaram a produção de um coagulante microbiano e suas características bioquímicas a partir do extrato enzimático bruto produzido por *Bacillus stearothermophilus* que exibiu alta atividade de coagulação (MCA), estabilidade térmica e ao pH, se configurando como uma ótima alternativa para ser utilizado como coagulante do leite em substituição do coalho de origem bovina.

Prado et al. (2021) avaliaram a produção de proteases por treze culturas de *Aspergillus* e concluíram que as características bioquímicas das proteases das espécies avaliadas demonstraram o uso potencial destes biocatalisadores na indústria de alimentos, em especial na elaboração de queijos.

Embora a maioria dos produtores e consumidores aceitam o uso de coagulantes de origem microbiana na produção de queijos, nos últimos anos os consumidores vêm mudando os hábitos alimentares, buscando por produtos mais naturais, provenientes de plantas e com características de sabor, aroma e textura diferenciados. Tal fato tem levado a uma demanda crescente por novos substitutos da quimosina e para essa finalidade tem se estudado fontes de proteases vegetais com propriedades de coagulação do leite (DUPAS et al., 2020).

2.2 Coagulantes de origem vegetal

Os coagulantes de origem vegetal apresentam alto potencial de coagulação do leite. Apesar de apresentarem-se como uma alternativa viável para fabricação de queijos, conferindo-lhes sabor, aroma e textura diferenciados, esses coagulantes têm sido pouco utilizados industrialmente, seu uso acontece principalmente em países da Europa como Portugal e Espanha (LIBURDI et al., 2018; GOSTIN e WAISUNDARA, 2019).

Muitos extratos vegetais são capazes de coagular o leite, entretanto existem alguns que são excessivamente proteolíticos como as peptidases de *Carica papaya* (papaína) e *Ananas comosus* (bromelina) (FERNANDES, 2015). Na Tabela 1 estão apresentados alguns exemplos de coagulantes vegetais aplicados como coagulantes do leite para a produção de queijo.

Tabela 1 - Exemplos de coagulantes vegetais utilizados para a produção de queijos.

Nome científico	Fonte Vegetal	Tipo de cultura	Tipo de protéase	Referência
<i>Foeniculum vulgare</i>	Funcho	Herbácea	Serina protéase	Bey et al., 2018
<i>Silybum marianum</i>	Cardo-mariano	Flor	Aspártica protéase	Colombo et al., 2018
<i>Cyphomandra betacea</i>	Tomateiro arbóreo	Fruto	Serina protéase	Li e Zhao, 2019
<i>Morinda citrifolia L.</i>	Noni	Fruto	Cisteína protéase	De Farias et al., 2020
<i>Solanum tuberosum</i>	Batata	Tubérculo	Aspártica protéase	Tito et al., 2020
<i>Cynara Cardunculus L.</i>	Flor do cardo	Flor	Aspártica protéase	Alavi e Momen, 2020

As fontes de coagulantes vegetais possuem proteases, assim como a quimosina bovina e microbiana. As proteases são enzimas produzidas por uma variedade de organismos, como plantas, animais e micro-organismos, como bactérias, leveduras e fungos. São classificadas principalmente como cisteína, metalo protease, serina, teonina e aspártico. As proteases aspárticas (EC 3.4.23), comumente chamadas de proteases ácidas, são polipeptídeos de cadeia simples com estruturas predominantemente de folha β (LI e ZHAO, 2019; PURUSHOTHAMAN et al., 2021).

Pertencem ao grupo das endopeptidases com resíduos de ácido aspártico no seu sítio ativo que são essenciais para a sua atividade catalítica. Atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas e apresentam afinidade em clivar aminoácidos hidrofóbicos. A maioria das proteases aspárticas apresentam pH ótimo entre 3,0 e 5,0 com pontos isoelétricos de 3,0-4,5. De acordo com Li et al. (2019), conforme o pH do leite diminui as cargas negativas fornecidas pela κ -

caseína são reduzidas e isso leva ao colapso parcial da κ -caseína. Portanto, quando a protease é adicionado ao leite em um pH mais baixo, a coagulação ocorre rápido, com menor taxa de degradação da κ -caseína. O peso molecular das proteases aspárticas pode variar de 30 a 50 kDa, além de serem ativas em uma ampla faixa de temperatura (GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011; PURUSHOTHAMAN et al., 2021)

A *Cynara Cardunculus* L. é a fonte vegetal de proteases aspárticas utilizada há anos na produção de queijo em países da região do Mediterrâneo, sendo que as proteases são extraídas das flores de cardo de várias espécies do gênero *Cynara* (principalmente *C. cardunculus* e, em menor grau, *C. humilis*) (FERNANDES, 2015; GOMES et al., 2019).

2.2.1 Coagulante de *Cynara cardunculus*

As flores do cardo (*Cynara cardunculus* L.) (Figura 3) pertencem ao gênero *Cynara*, família *Asteraceae*. É uma planta anual e cresce em algumas partes do sul e nordeste de Portugal, Espanha, Ilhas Canárias, Norte da África e Ilha da Madeira, sendo utilizadas nos países do mediterrâneo para a produção tradicional de queijos artesanais devido às proteases aspárticas com capacidade de coagulação do leite. Os queijos produzidos utilizando essas proteases são geralmente fabricados em pequena escala em alguns países mediterrâneos e adquiridos sob o Registro de Indicações Geográficas Protegidas e Denominação de Origem devido à sua textura, sabor e aroma únicos (ALAVI e MOMEN, 2020).

Figura 3 - *Cynara cardunculus* L.



Fonte: Próprio autor.

Espanha e Portugal detêm a maior variedade e produção de queijos a partir da flor do cardo. Em Portugal, tradicionalmente os queijos Serra da Estrela, Serpa e Azeitão são produzidos com leite

ovino enquanto o queijo Castelo Branco é produzido com leite bovino, além disso, na Espanha é possível encontrar o queijo La Serena e o Manchego produzidos com leite de ovinos. Na produção de todos esses queijos são utilizadas as proteases presentes nas flores do cardo como coagulante do leite (ALMEIDA et al., 2017; LLORENTE et al., 2014a).

Os pistilos do cardo (conjunto de órgãos femininos das flores) são compostos de várias proteases, sendo as principais cardosina A e cardosina B com alto potencial coagulante alternativo ao coalho animal (ALMEIDA et al., 2017). Segundo Alavi e Momen (2020), o extrato bruto obtido das flores do cardo contém aproximadamente 75% de cardosina A e 25% da cardosina B. Entretanto, a cardosina B apresenta maior atividade proteolítica do que a anterior. Essas proteases são semelhantes em termos de especificidade e atividade da quimosina (cardosina A) e pepsina (cardosina B) (LIBURDI et al., 2018), mas possuem uma forte ação proteolítica no leite ovino que leva à extensa quebra de caseínas, produzindo queijos caracterizados por uma textura macia amanteigada e o desenvolvimento de um aroma típico e sabor levemente picante (ALMEIDA et al., 2017; ZIKIOU; ZIDOUNE, 2019).

As proteases presentes nas flores do cardo são do tipo aspárticas, mais ativas em pH ácido, com atividade proteolítica máxima em pH 5,0 e 5,5 e estabilidade térmica em uma faixa de temperatura de 37 a 60°C. São responsáveis pela atividade catalítica e mostram especificidade preferencial para clivagem em ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (AMIRA et al., 2017; ZIKIOU; ZIDOUNE, 2019)

Segundo Amira et al. (2017), quando se deseja fabricar queijos com proteases vegetais, a seleção de um coagulante vegetal adequado é um fator crítico que influencia nas características do produto final. De acordo com Mazorra-Manzano et al. (2013) para que um coagulante vegetal seja considerado eficiente ele deve apresentar uma maior atividade de coagulação do leite (MCA) na κ -caseína e uma baixa atividade proteolítica não específica (AP). Consequentemente, a proporção dessas atividades (MCA / AP), chamada de razão de especificidade (R) é considerada crucial na avaliação da aplicabilidade de uma preparação enzimática, que deve apresentar R igual ou maior que a quimosina para ser considerado como seu substituto. Indicam que, essa proporção está relacionada às propriedades texturais e sensoriais do queijo e um alto valor dessa relação leva a uma grande redução do amargor (DE FARIAS et al., 2020).

As proteinases aspárticas de flores de *Cynara cardunculus* L. têm sido extensivamente estudadas. Galán et al. (2008) avaliaram a influência de diferentes quantidades de coagulante vegetal, utilizando para isso a flor do cardo *Cynara cardunculus* e coalho de origem animal sobre a proteólise e características sensoriais de queijos produzidos com leite de ovelha. Verificaram que para a maioria dos parâmetros químicos estudados não foram observadas diferenças entre os coagulantes testados, porém, os índices de proteólise (extensão e profundidade) e sensoriais dos

queijos produzidos com o coagulante vegetal foram maiores do que as formulações produzidas com coalho de origem animal.

Amira et al. (2017) estudaram o efeito do pH de extração nas propriedades físico-químicas e atividades enzimáticas de extratos brutos de flores de *Cynara cardunculus* L. coletados na Tunísia. Os resultados para o valor da razão de especificidade (R) mostraram um aumento considerável com a queda do pH, atingindo um valor máximo de 28,71 para o extrato do cardo em pH 3. Este valor excedeu o da quimosina (23,59), e os autores concluíram que a redução do pH do coalho de 6 para 3 contribuiu para o aumento da razão de especificidade e do percentual de enzima extraída.

Zikiou e Zidoune (2019) investigaram as propriedades de coagulação do leite e uso na fabricação de um queijo tipo camembert utilizando extrato enzimático de flores de *Cynara cardunculus* L. argelino. Os extratos obtidos apresentaram atividade de coagulação em pH 5 e temperatura de 60°C, além disso, os extratos apresentaram uma menor atividade de coagulação do leite e maior atividade proteolítica, devido à sua menor especificidade em hidrolisar a caseína, o que pode levar a perdas de rendimento no queijo.

Gomes et al. (2019) caracterizaram 15 ecótipos de flores de *Cynara cardunculus* L. da região do Alentejo, em Portugal utilizados como um agente coagulante para fabricação de queijo. O estudo realizado encontrou diferença para a concentração de enzimas (cardosinas) e no perfil enzimático, além disso, identificaram variabilidade nas propriedades tecnológicas da flor de cardo colhida na região do Alentejo.

Zikiou et al. (2020) realizaram o estudo da caracterização de proteases de flores de duas variedades de cardo argelino e avaliaram suas propriedades coagulantes do leite. Além disso, realizaram uma comparação com as proteases extraídas da variedade de cardo portuguesa. Os estudos evidenciaram que os extratos argelinos apresentaram atividades de coagulação do leite significativamente maiores do que o extrato de flores portuguesas. Essa menor atividade de coagulação foi explicada pela menor quantidade de cardosinas presentes no extrato português.

Barracosa et al. (2021) utilizaram extratos aquosos das flores de cardo obtidos de 6 plantas (1M–6M) com perfis distintos de cardosina cultivadas na região da Serra da Estrela em Portugal. Avaliaram a atividade proteolítica e de coagulação do leite com a finalidade de melhorar a textura dos queijos. Os resultados indicaram que as plantas 4M, 5M e 6M apresentaram maior concentração de cardosina A, com ação proteolítica sob a κ -caseína e menor tempo de coagulação resultando em queijos de textura mais firme. Os autores concluíram que a diversidade bioquímica das flores do cardo influencia na ação sob às caseínas, atuando na textura do queijo. Além disso, o estudo pode ajudar produtores de queijo a selecionar as flores de cardo adequadas para obter queijos com textura diferenciada.

Há muitos anos a flor do cardo (*Cynara cardunculos* L.) vem sendo utilizada e estudada

como coagulante do leite, no entanto, as proteinases de outras plantas do gênero *Cynara*, como a alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) são menos conhecidas, provavelmente porque a flor desta planta é geralmente consumida como vegetal e em preparações culinárias (LLORENTE et al., 2014a).

2.2.2 Coagulante de *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*

A espécie *Cynara cardunculus* L. compreende três variedades, a alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* L. Fiori) (Figura 4), o cardo cultivado (*Cynara cardunculus* L. var. *altilis*) e o cardo selvagem (*Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris* L. Fiori), todos pertencentes à família *Asteraceae* que normalmente têm folhas grandes e arqueadas, e cabeças de flores roxas ou azuladas (RICCERI e BARBAGALLO, 2016).

Figura 4 - *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*.



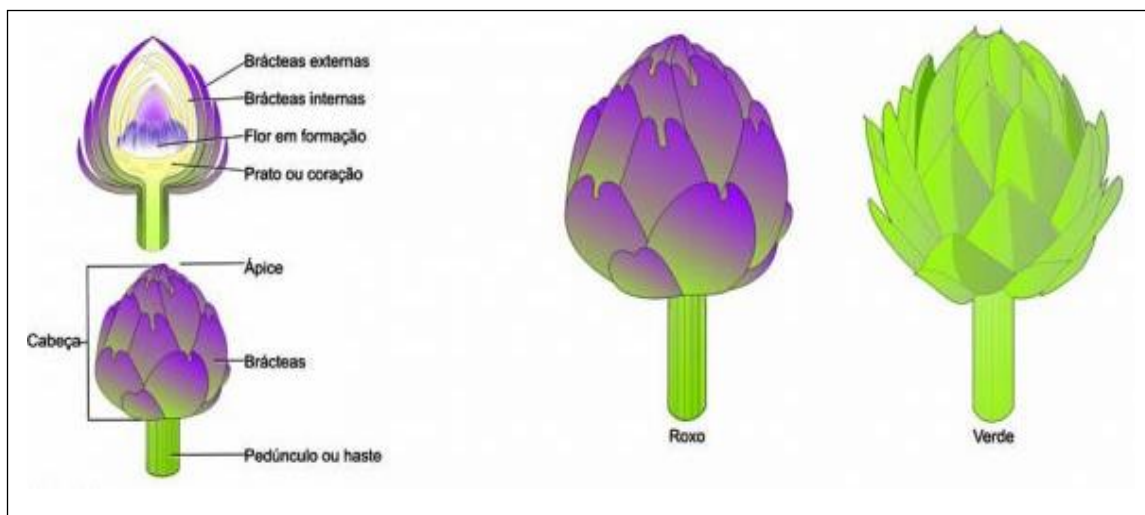
Fonte: Próprio autor.

As alcachofras são nativas do sul da Europa, na região do Mediterrâneo, e seu cultivo se dá por meio de sementes, onde as condições de verão seco e quente são ideais para seu crescimento e reprodução. Foi difundida mundialmente principalmente para fins alimentícios e tornou-se apreciada por seu sabor doce e amargo, dado pela inflorescência comestível das plantas chamada de “cabeça” (TENGILIMOGLU-METIN; KIZIL, 2017; ZAYED; FARAG, 2020).

No Brasil, o cultivo da alcachofra apresenta potencial de expansão. Foi trazida ao país há mais de 100 anos, como um produto exótico (EMBRAPA, 2021). Estima-se que em 2019, a produção no estado de São Paulo foi de 4,32 milhões de cabeças de alcachofra, segundo dados do Instituto de Economia Agrícola (IEA-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento de São Paulo. Conhecida pelo sabor único e de extrema versatilidade, vem se popularizando no país. Os estados brasileiros que realizam o cultivo da alcachofra são: Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo, no qual o plantio está concentrado em três municípios: São Roque, Ibiúna e, principalmente, Piedade, que é o maior produtor do Brasil, com área plantada de 120 hectares, cultivando a variedade roxa da flor (AGRICULTURA, 2021; REOLON-COSTA; GRANDO; CRAVERO, 2017).

As alcachofras são semelhantes ao cardo, sendo plantas perenes e sensíveis ao frio. Apresentam botões florais comestíveis, que brotam da porção terminal da haste principal e nas hastes laterais (Figura 5). Cada broto da flor não aberta se assemelha a uma pinha verde-escura, de 7 a 10cm de diâmetro, redonda, mas levemente alongada. Possui várias brácteas internas e externas pontudas e cor de couro em torno de uma flor azul-púrpura. A base de cada bráctea é a porção carnuda comestível, junto com o centro carnoso, também chamado de coração da alcachofra, sobre a qual a flor e as brácteas são carregadas (GOSTIN; WAISUNDARA, 2019; GRANDI, 2014).

Figura 5 - Flor de alcachofra (*Cynara. cardunculus* L. var. *scolymus*).



Fonte: (CEAGESP, 2021).

As flores da alcachofra, assim como as flores do cardo, possuem proteases aspárticas com capacidade de coagulação do leite para a produção de queijos, porém, são amplamente consumidas como alimento antes de florescer, e outras possíveis utilizações dessa planta são menos conhecidas (ESPOSITO et al., 2016).

Em estudos como os de Esposito et al. (2016), Llorente et al. (2014) e Chazarra et al. (2007), avaliaram a purificação das proteinases de *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* e identificaram três proteinases (cianarinas ou cardosinas A, B e C) com atividade de coagulação do leite. Todas são glicoproteínas e compostas de uma subunidade grande e uma pequena, que, assim como as enzimas das flores do cardo, mostraram agir sobre a κ -caseína de maneira semelhante à quimosina, clivando a ligação peptídica Phe₁₀₅-Met₁₀₆ na κ -caseína bovina e ovina, enquanto a κ -caseína caprina é preferencialmente clivada em Lys₁₁₆-Thr₁₁₇. As duas enzimas (cardosinas A e B) também podem hidrolisar as caseínas α e β para produzir queijos caracterizados por uma textura macia e amanteigada, com aroma típico e um sabor levemente picante e cremoso (LLORENTE et al., 2014a).

Essas enzimas possuem máxima atividade proteolítica em pH 5,0, e estabilidade à temperatura de 37°C, temperatura usualmente aplicada na produção de queijos coagulados pela ação da quimosina, tornando o extrato bruto dessa flor potencialmente útil para a produção de queijo, porém, a utilização do extrato da *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* na produção de queijos é pouco estudada (ABD EL-SALAM; IBRAHIM; EL-SAYED, 2017; LLORENTE et al., 2014a).

Alguns estudos já foram realizados sobre a atividade enzimática das flores da alcachofra e sua aplicação como coagulante do leite. Sidrach et al. (2005) realizaram a purificação de três proteinases (cianarinas A, B e C) com propriedades de coagulação do leite a partir da flor da alcachofra. Os estudos de atividade proteolítica e de inibição indicaram que as proteases presentes na flor da alcachofra são do tipo ácido aspártica, e indicam que o extrato de alcachofra pode ser utilizado na indústria de leite da mesma forma que o extrato obtido da flor do cardo.

Chazarra et al. (2007) realizaram a caracterização das propriedades coagulantes do leite utilizando os extratos de flores de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*). Os resultados indicaram que os extratos apresentaram atividade de coagulação máxima em pH 4 e a concentração de 50mM de CaCl₂ foi considerado ideal para a coagulação do leite. Os autores concluíram que os resultados obtidos no estudo sobre as propriedades coagulantes da alcachofra são importantes e indicam a possibilidade do uso deste coagulante na fabricação de queijo.

Silva et al. (2021) utilizaram extratos das folhas da alcachofra para analisar sua atividade proteolítica, coagulante e características cromatográficas. Os extratos das folhas da alcachofra apresentaram elevada atividade proteolítica e de coagulação utilizando tampão citrato de sódio (pH 3,0). Nesse contexto, os autores concluíram que a alcachofra produzida no Brasil pode ser considerada como uma nova fonte de coagulante do leite.

Em relação à fabricação de queijos com o extrato da flor da alcachofra, poucos estudos foram encontrados nos últimos 10 anos. Llorente et al. (2014) utilizaram extratos aquosos da flor de

Cynara cardunculus L. var. *scolymus* como substituto de coalho bovino na fabricação de queijo do tipo Gouda em escala piloto, e concluíram que o tipo de coagulante (bovino ou vegetal) não teve efeito significativo nos parâmetros químicos dos queijos analisados durante a maturação. Também não foram identificadas diferenças sensoriais significativas entre os queijos fabricados com *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* ou coalho bovino. Os resultados encontrados indicaram que o extrato de flor de *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* foi adequado para substituir o coalho bovino na produção de queijos do tipo Gouda.

García et al. (2016) avaliaram as alterações físico-químicas, microbiológicas, texturais e sensoriais durante a maturação do queijo de cabra pasteurizado produzido com coagulante vegetal (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*). A composição físico-química e as frações de nitrogênio do queijo sofreram modificações ao longo do tempo de maturação, modificando sua textura e parâmetros sensoriais.

El-Salam; Ibrahim; El-Sayed Razek (2017) utilizaram extratos brutos e purificados obtidos das flores de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) na produção do queijo macio branco. Seus resultados indicaram que os extratos brutos e purificados apresentaram atividade ótima de coagulação em pH 6,5 e 5,5, respectivamente. Os queijos elaborados com o extrato bruto apresentaram maiores teores de acidez e proteína.

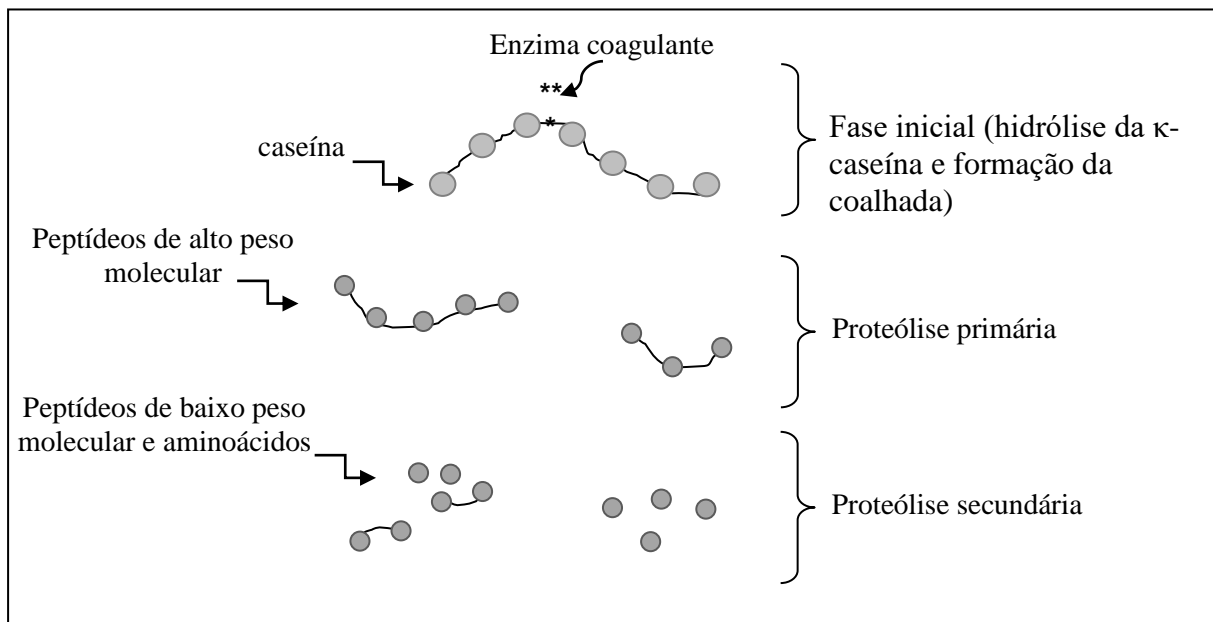
É importante a caracterização das enzimas utilizadas na coagulação do leite, principalmente se forem de fontes vegetais. Entender sua ação na hidrólise da caseína e seu efeito na proteólise pode levar a informações importantes, que são necessárias por exemplo para estabelecer as condições operacionais mais apropriadas na produção do queijo a partir desse coagulante (GOMES et al., 2019).

3. Proteólise

A proteólise é um processo importante que ocorre durante a etapa de maturação do queijo, representada por um conjunto de reações físicas, bioquímicas e microbiológicas que influenciam a qualidade final do produto (TOMASZEWSKA-GRAS et al., 2019).

A proteólise no queijo é um processo gradual e pode ser dividida em três etapas principais: coagulação do leite, proteólise primária e proteólise secundária (Figura 6). A coagulação da coalhada é resultado da ação hidrolítica do coagulante sob a κ -caseína ao romper a ligação peptídica Phe₁₀₅-Met₁₀₆. A proteólise primária ocorre pela ação do coagulante residual que fragmenta a molécula original em polipeptídeos de tamanhos diversos. Já a proteólise secundária é a degradação contínua de fragmentos peptídicos em peptídeos de cadeias menores e aminoácidos livres pela ação das peptidases dos micro-organismos iniciantes (fermento adicionado ao leite) (IVENS et al., 2017; ORDÓÑEZ et al., 2005).

Figura 6 - Representação das etapas da proteólise no queijo.



Fonte: Próprio autor.

À medida que a maturação do queijo ocorre, a quantidade de peptídeos de alto peso molecular do queijo diminui drasticamente ocasionando a liberação de peptídeos de baixo peso molecular e resíduos de aminoácidos livres. Os peptídeos solúveis em pH 4,6 são tipicamente derivados da ação da quimosina sob α_{S1} -caseína, enquanto os fragmentos insolúveis em pH 4,6 são tipicamente γ -caseína derivados da ação da plasmina sob β -caseína (IVENS et al., 2017; VÉLEZ et al., 2015).

A α_{S1} -caseína é considerada o principal elemento estrutural em diversas variedades de queijo. A medida que essa caseína sofre hidrólise ocorre o enfraquecimento da rede de proteínas, resultando na mudança da textura do queijo (LAMICHHANE; KELLY; SHEEHAN, 2018). Segundo Kongo e Malcata (2015), durante o período de 1-2 semanas de maturação a textura do queijo sofre alterações marcantes, devido ao enfraquecimento da rede proteica.

Os coagulantes de origem vegetal agem sobre a κ -caseína de maneira semelhante à quimosina. As enzimas presentes nesses coagulantes também podem hidrolisar as caseínas α_{S1} e β para produzir queijos caracterizados por uma textura macia e pastosa, além de gosto ácido e sabor amanteigado (LLORENTE et al., 2014a).

A hidrólise das proteínas durante a proteólise, além de resultar em mudanças da textura do queijo, também leva à formação de peptídeos. Dentre os peptídeos formados, pode-se encontrar na matriz do queijo os peptídeos bioativos, que são fragmentos de proteínas específicas e desempenham um papel significativo no corpo humano, além de apresentarem várias atividades

biológicas, incluindo propriedades anti-hipertensivas, anticoagulantes, antioxidantes e antibacteriana (BANIHASHEMI et al., 2020; TIMÓN et al., 2014).

3.1 Peptídeos bioativos com atividade antioxidante

Peptídeos bioativos são fragmentos específicos de proteínas, que apresentam características multifuncionais, que incluem as propriedades anticoagulantes, anti-hipertensivas, antimicrobianas e antioxidantes. Avaliar a atividade antioxidante desses compostos nos queijos podem auxiliar na manutenção da saúde do consumidor. O excesso de radicais livres e espécies reativas de oxigênio podem causar morte celular programada (apoptose) pela oxidação de proteínas celulares, enzimas, DNA e lipídios da membrana celular. Os antioxidantes naturais presentes na matriz do queijo podem eliminar essas espécies oxidativas e reduzir a progressão de muitas doenças crônicas causadas pela oxidação de componentes celulares (COLOMBO et al., 2018; MUNIR et al., 2020).

A atividade antioxidante dos peptídeos gerados no queijo é associada aos fragmentos compostos de uma sequência de aminoácidos específicos de 5-11 aminoácidos, que podem incluir aminoácidos hidrofóbicos, como prolina, tirosina, triptofano ou histidina (TIMÓN et al., 2014). Múltiplos mecanismos têm sido atribuídos para explicar a atividade antioxidante dos peptídeos, como eliminação de radicais, inibição da peroxidação lipídica e redução férrica (TIMÓN et al., 2019).

Existem métodos diferentes de avaliação da atividade antioxidante que dependem de diferentes geradores de radicais livres, agindo por diferentes mecanismos. A combinação de métodos deve ser usada para avaliar as atividades antioxidantes *in vitro* para abranger todos os aspectos da eficácia antioxidante (TIMÓN et al., 2014; TOLDRÁ et al., 2018).

Os métodos baseados em transferência de elétrons avaliam a capacidade de um agente antioxidante transferir um elétron para reduzir um oxidante. Os ensaios de eliminação do radical ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico), poder redutor férrico (FRAP) e a atividade de remoção de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) são usados para essa medição (PEPE et al., 2016; TOLDRÁ et al., 2018).

A análise de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico indica ação antioxidante secundária. O método de oxidação do β -caroteno/ácido linoleico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (TOLDRÁ et al., 2018).

Alguns estudos vêm sendo realizados na identificação de peptídeos bioativos em queijos com atividade antioxidante. Pepe et al. (2016) acompanharam a liberação de peptídeos bioativos em queijo de massa mole típico italiano e identificaram que os peptídeos gerados apresentaram atividade antioxidante em uma ampla faixa de concentração e isso destaca o potencial do queijo estudado como alimento promotor da saúde.

Timón et al. (2019) identificaram peptídeos antioxidantes em queijo utilizando coagulante de origem animal (95% quimosina e 5% pepsina bovina), vegetal (*Cynara cardunculus* L.) e microbiana (*Mucor miehei*). Os resultados sugeriram que os extratos de queijo produzido com coalho microbiano apresentaram a maior atividade antioxidante.

Munir et al. (2020) avaliaram a aplicação de diferentes técnicas de processamento do leite para melhorar a atividade antioxidante do queijo Cheddar, durante a maturação. O leite foi submetido a diferentes pré-tratamentos (ultrassom, alta pressão e micro-ondas). Os resultados mostraram que a taxa de proteólise durante a fabricação do queijo e a maturação subsequente foi significativamente afetada pelo pré-tratamento. A atividade antioxidante nos queijos produzidos com leite pré-tratado aumentou significativamente ($p < 0,05$).

3.2 Peptídeos bioativos com atividade antibacteriana

Durante o processo de produção e maturação do queijo peptídeos com atividades bioativas podem ser liberados, como os peptídeos com atividade antibacteriana. Os peptídeos antibacterianos podem ser considerados componentes fundamentais para o sistema imunológico atuando na defesa natural do organismo contra patógenos, ou seja, apresentam capacidade de eliminar células-alvo (LIMA et al., 2017).

Os peptídeos antibacterianos geralmente apresentam resíduos de 20-46 aminoácidos, possuem carga elétrica positiva, são ricos em lisina ou arginina e em sua maioria são anfipáticos, o que capacita a molécula de se apresentar solúvel em meio aquoso e facilmente inserida nas membranas lipídicas, possibilitando a morte do micro-organismo alvo, além disso, podem adotar uma estrutura linear ou circular α -helicoidal organizada em uma folha β que é essencial contra micro-organismos (DIAS et al., 2019; TOLDRÁ et al., 2018).

Segundo Dias et al. (2019), o mecanismo de ação dos peptídeos antibacterianos ainda não é bem conhecido, mas acredita-se que sua ação depende da sua capacidade de atravessar a membrana microbiana formando canais ou poros dentro dela, prejudicando a possibilidade de processos anabólicos. Além disso, possui a capacidade de distinguir células bacterianas das células de mamíferos, baseado na composição diferente dos lipídios das membranas dessas células e apresentam a atividade diante de bactérias Gram-positivas como *B. subtilis* e Gram-negativas como *E. coli*.

Estudos vêm sendo realizados para identificação e avaliação da atividade antibacteriana dos peptídeos em queijos. Pritchard et al. (2010) realizaram a identificação de peptídeos bioativos em queijos Cheddar australiano comerciais. A ação antibacteriana dos peptídeos extraídos dos queijos foi testada em três bactérias *E. coli*, *B. cereus* e *S. aureus*. Os resultados indicaram que os peptídeos do queijo inibiram o crescimento das bactérias testadas e concluíram que suas descobertas

sugerem que os extratos peptídicos dos queijos Cheddar exibem propriedades antibacteriana atuando como um agente bacteriostático.

Lima et al. (2017) investigaram o queijo coalho artesanal como fonte alternativa de peptídeos antibacterianos. Os extratos peptídicos apresentaram atividade antibacteriana diante dos micro-organismos *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosas* na concentração de 225mg/mL. Foi possível concluir que o queijo coalho, nas condições estudadas, apresentou peptídeos capazes de inibir o crescimento dos micro-organismos patogênicos testados.

Fialho et al. (2018) estudaram a extração e identificação de peptídeos antibacterianos do queijo minas artesanal da Canastra-MG de três diferentes produtores (A, B e C) durante 30 dias de maturação. As frações com atividade antibacteriana sobre a *E. coli* foram extraídas do queijo Minas artesanal da Canastra com 9, 23 e 30 dias de maturação, e os resultados mostraram que os queijos do produtor A com 9 dias de maturação e os queijos do produtor C com 23 e 30 dias de maturação apresentaram atividade bactericida contra *E. coli*.

4. Estudos do perfil proteico do queijo: metodologias analíticas

Queijos produzidos com coagulantes de diferentes fontes podem ter sua composição química variável. Gonçalves et al. (2016) afirmam que a composição dos queijos pode variar de acordo com a matéria-prima utilizada, além do processamento que é empregado para sua obtenção. Portanto, o uso de diferentes métodos para avaliar as alterações ocasionadas pela utilização de coagulantes de fontes distintas é interessante.

O estudo do perfil proteico é adequado para avaliar as alterações que ocorrem nos queijos produzidos com coagulantes de origens diferentes e que são submetidos a períodos de maturação. Os métodos baseados em padrões de proteína para avaliar essas alterações incluem eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e técnicas espectroscópicas vibracionais como infravermelho médio (MIR) (DE JESUS et al., 2020; GONÇALVES et al., 2017; ORDIALES et al., 2012).

A eletroforese em gel dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) é uma rotina usada para separar proteínas com base em seu peso molecular. Em queijos maturados é comumente usada para avaliar a hidrólise da caseína e o tipo de proteólise (SONBOLI et al., 2021). O método é baseado na desnaturação das proteínas em cadeias lineares com cargas negativas por SDS, um detergente aniônico usado para desnaturar as proteínas e normalizar sua proporção massa-peso constante para todas as proteínas. A interação das proteínas com SDS leva à sua desnaturação e destruição da estrutura terciária, bem como clivagem de ligações dissulfeto na presença de DTT (ditiotreitól) ou 2-ME (2-mercaptoetanol). Após a desnaturação, as proteínas migram através da

matriz do gel de poliacrilamida com base em seu tamanho (GONÇALVES et al., 2017; SONBOLI et al., 2021).

O gel de SDS-PAGE pode ser corado usando uma variedade de corantes que permitem a visualização e investigação das proteínas que estão presentes nas amostras analisadas. As bandas que ficam presentes após a coloração, podem ser identificadas analisando-se a imagem (SMITH et al., 2022).

Alves et al. (2013) compararam o efeito de duas proteases fúngicas na produção de queijos, uma já comercialmente estabelecida como agente de coagulação do leite e outra produzida em escala laboratorial na composição de queijo Prato. Os queijos foram monitorados quanto à proteólise e degradação da caseína por eletroforese capilar. Os resultados demonstraram boa separação e o perfil eletroforético mostraram que os queijos apresentaram perfis semelhantes de hidrólise proteica.

Liburdi et al. (2018) realizaram um estudo da coagulação contínua do leite utilizando extrato floral de *Cynara cardunculus* L., coalho de vitelo e a mistura dos dois. Analisaram o perfil eletroforético de proteínas das frações insolúveis dos queijos e concluíram que independente da mistura do coagulante as amostras apresentaram o mesmo perfil eletroforético, identificando as frações α_{s1} -, α_{s2} - e β -caseína.

Já a cromatografia líquida de alta eficiência é utilizada para separar, identificar e quantificar proteínas e peptídeos, principalmente os peptídeos solúveis em água de queijos maturados. É caracterizada pelo processo de eluição de solutos em fase móvel líquida, em que os componentes presentes em determinada amostra são particionados na fase estacionária (GONÇALVES et al., 2017).

O estudo das frações da caseína e os peptídeos formados ao longo do tempo de maturação pode ser útil para obter informações sobre a ação dos diferentes sistemas proteolíticos envolvidos na maturação do queijo, como por exemplo, a ação enzimática específica dos coagulantes de origem vegetal. A identificação dos produtos proteolíticos mais abundantes nos diferentes tempos de maturação pode fornecer indicações diretas sobre as enzimas ativas no queijo e sua dinâmica (GONÇALVES et al., 2016).

A Espectroscopia no Infravermelho Médio (MIR) é uma ferramenta analítica que tem sido utilizada para avaliar o período de maturação de queijos (DE JESUS et al., 2020). Em comparação com os métodos convencionais de avaliação da composição química e características físico-química, eletroforese e cromatografia, o MIR mostra-se com maior eficácia em menor tempo de análise, principalmente por não necessitar de preparação prévia da amostra (TAHIR et al., 2017).

O MIR estuda a interação entre a radiação eletromagnética com a matéria. Seu principal objetivo é avaliar o modo das vibrações das ligações químicas e é bastante utilizada nas

determinações qualitativas e quantitativas das espécies orgânica e inorgânica, como também no controle do processo de separação e acompanhamento de reações bioquímicas, como a proteólise (GONÇALVES et al., 2020).

Wang et al. (2020) realizaram análise no MIR na identificação da estrutura secundária das proteases presentes nas sementes de *Moringa oleifera*. Após a extração dos peptídeos presente nas sementes, foram identificadas as estruturas secundárias da proteína usando um o infravermelho médio. Um software foi usado para analisar o espectro, a posição e o número dos sub-picos que foram estimados ajustando a forma do pico gaussiano. Com base na relação entre os sub-picos e a estrutura secundária, o conteúdo relativo de cada estrutura secundária foi calculado usando a área integrada. A análise no MIR revelou informações sobre a estrutura das proteínas, e concluíram que a protease purificada apresentou 27,66% da estrutura secundária α -hélice, 45,68% da folha- β .

5. Perfil sensorial de queijo

O perfil sensorial é uma técnica usada principalmente para caracterizar produtos na indústria de alimentos. Os métodos sensoriais descritivos, fornecem resultados mais detalhados, constituindo-se em uma das mais importantes ferramentas da análise sensorial e são utilizados para determinar o perfil sensorial dos produtos (DE ALCANTARA e DE GRANDI CASTRO FREITAS-SÁ, 2018).

Os métodos descritivos têm a finalidade de determinar quais características sensoriais são perceptíveis e importantes para a qualidade do produto analisado. Para isso, o instrumento de medição é o homem, que, convencionalmente realiza um treinamento do painel sensorial para se tornar instrumento analítico por meio dos sentidos sensoriais. Analisa as características dos produtos em relação à aparência, aroma, sabor e textura. Após a identificação dos atributos presentes no alimento, estes podem ser quantificados em relação à intensidade na matriz alimentar, obtendo-se um perfil sensorial (MINIM; DA SILVA, 2016).

Queijos produzidos com diferentes coagulantes e submetidos a etapa de maturação geralmente são caracterizados por métodos sensoriais descritivos, devido às mudanças que ocorrem na matriz do queijo, alterando a aparência, aroma, sabor e textura. El-Salam et al. (2019) realizaram a avaliação sensorial de queijos macio branco produzidos com flores de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. *scolymus*) e coalho como coagulante. Os queijos foram avaliados por 15 provadores treinados que atribuíram pontuação máxima de 50 pontos para sabor, 40 pontos para estrutura e textura e 10 pontos para aparência do queijo. A pontuação para os atributos estrutura e textura foi significativa, indicando diferença entre os queijos produzidos com flores de alcachofra e coalho. O queijo produzido com flores de alcachofra foi caracterizado com textura macia e com estrutura cremosa, devido a proteólise no queijo.

Colombo et al. (2018) realizaram análise sensorial descritiva em queijos produzidos com

misturas de quimosina e um coagulante vegetal a partir de flores de *Silybum marianum*. O painel sensorial avaliou os queijos quanto aos atributos: aparência, textura, aroma, sabor e a aceitabilidade geral, e concluíram que o queijo fabricado com coagulante vegetal apresentou um leve sabor amargo.

García et al. (2016) estudaram as alterações sensoriais durante a maturação (15, 45 e 75 dias) do queijo de cabra produzido com coagulante vegetal (*Cynara cardunculus* L. *scolymus*). Para isso realizaram um teste descritivo com 10 provadores treinados. Os provadores caracterizaram o queijo com 15 dias de maturação com maior aroma de cabra. Já os parâmetros de sabor caprino, gosto amargo e salgado não variaram com tempo de maturação, porém os provadores caracterizaram o queijo com 75 dias de maturação com menor gosto ácido. A partir desses resultados, concluíram que com o uso coagulante vegetal é possível obter queijos com qualidade sensorial de até 75 dias de maturação.

Llorente et al. (2014) caracterizaram sensorialmente o queijo Gouda produzido com extrato da flor da alcachofra imerso em salmoura por 30 e 40 horas. Um painel sensorial composto por 12 provadores treinados avaliaram a aparência (uniformidade, cor e olhaduras), textura (elasticidade e dureza) e o sabor. O painel sensorial detectou um sabor amargo nos queijos imersos na salmoura por 30 horas, porém, com 40 horas de imersão não foi detectado a presença do gosto amargo, indicando que a imersão do queijo na salmoura por 40 horas evitou a quebra excessiva da caseína, impedindo o desenvolvimento do gosto amargo.

Dentre as metodologias descritivas a Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) é mais utilizada na obtenção do perfil sensorial dos queijos produzidos com extratos vegetais. Permite o levantamento, a descrição e quantificação dos atributos sensoriais detectáveis no produto, utilizando julgadores treinados, repetibilidade e análise estatística nos resultados. É considerada um dos métodos mais completos e sofisticados para caracterização sensorial de atributos em alimentos, é apropriada quando a avaliação exige informações detalhadas sobre o perfil sensorial de um determinado produto (LAWLESS; HEYMANN, 1999)

Essa metodologia apresenta algumas limitações, como o tempo necessário para treinamento dos avaliadores que pode ser relativamente longo, e o número de sessões/ treinamento está relacionado à complexidade do produto, o que pode ser restritivo, particularmente quando se exigem respostas rápidas (DE ALCANTARA e FREITAS-SÁ, 2018).

Em alternativa à ADQ, diversas metodologias vêm sendo estudadas, como as técnicas Perfil *Flash*, *Napping*®, *Check-All-That-Apply* (CATA) e metodologias derivadas de variações desses métodos. Essas metodologias demonstraram redução no tempo para a realização do teste descritivo, dispensando o treinamento, no entanto, existem limitações para sua aplicabilidade devido à obtenção de resultados apenas qualitativos, sendo possível obter apenas o mapa sensorial dos

produtos (SILVA et al., 2012).

O Perfil Descritivo Otimizado (PDO) é um método que pode ser usado em alternativa aos métodos citados, por ser um teste descritivo em que obtém-se dados qualitativos e quantitativos, se destacando por ser uma metodologia rápida, onde os julgadores são classificados como semitreinados (julgadores que passaram pelas etapas de recrutamento, pré-seleção e participação da reunião de definição dos atributos sensoriais e da apresentação das referências (SILVA et al., 2012).

Por ser uma metodologia rápida, possibilita a descrição quantitativa dos atributos sensoriais, fornece resultados válidos semelhantes a ADQ. Na metodologia PDO é necessária uma equipe de no mínimo 16 avaliadores, que avaliam as amostras de acordo com o protocolo atributo por atributo, onde todas as amostras são analisadas simultaneamente para apenas um atributo por vez (MINIM e DA SILVA, 2016).

A obtenção do perfil sensorial dos queijos que são produzidos com coagulantes alternativos à quimosina é de extrema importância, pois os atributos presentes nas amostras influenciarão diretamente na aceitação do consumidor final.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-SALAM, B. A. E.-Y.; IBRAHIM, O. A. E.-H.; EL-SAYED, H. A. E.-R. Purification and characterization of milk clotting enzyme from artichoke (*Cynara cardunculus* l.) flowers as coagulant on white soft cheese. **International Journal of Dairy Science**, v. 12, n. 4, p. 254–265, 2017.
- ABIQ. **Associação Brasileira das Indústrias de Queijo**. , 2021.
- AFSHARNEZHAD, M.; SHAHANGIAN, S. S.; SARIRI, R. A novel milk-clotting cysteine protease from *Ficus johannis*: Purification and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 173–182, 2019.
- AGRICULTURA. **SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO – São Paulo**. , 2021.
- AHMED, S. A. et al. Novel milk-clotting enzyme from *Bacillus stearothermophilus* as a coagulant in UF-white soft cheese. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 241–249, 2016.
- AIDER, M. Potential applications of ficin in the production of traditional cheeses and protein hydrolysates. **JDS Communications**, v. 2, n. 5, p. 233–237, 2021.
- ALAVI, F.; MOMEN, S. Aspartic proteases from thistle flowers: Traditional coagulants used in the modern cheese industry. **International Dairy Journal**, v. 107, p. 104709, 2020.
- ALBENZIO, M. et al. Composition and sensory profiling of probiotic Scamorza ewe milk cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 2792–2800, 2013.
- ALMEIDA, C. M. et al. Functional and structural characterization of synthetic cardosin B-derived rennet. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 18, p. 6951–6968, 2017.
- ÁLVAREZ RAMOS, L. et al. Antioxidant and antihypertensive activity of Gouda cheese at different stages of ripening. **Food Chemistry: X**, v. 14, n. July 2021, 2022.
- ALVES, L. S. et al. Yield, changes in proteolysis, and sensory quality of Prato cheese produced with different coagulants. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 12, p. 7490–7499, 2013.
- AMIRA, B. A. et al. Effect of extraction pH on techno-functional properties of crude extracts from wild cardoon (*Cynara cardunculus* L.) flowers. **Food Chemistry**, v. 225, p. 258–266, 2017.
- ANUSHA, R.; SINGH, M. K.; BINDHU, O. S. Characterisation of potential milk coagulants from *Calotropis gigantea* plant parts and their hydrolytic pattern of bovine casein. **European Food Research and Technology**, v. 238, n. 6, p. 997–1006, 2014.
- AOAC. **Association of Official Analytical Chemists**. In W. Horowitz (Ed.), **Official methods of analysis of AOAC International**. 20th ed. ed. Rockville, USA: [s.n.].
- ARRUDA, M. S. et al. New peptides obtained by hydrolysis of caseins from bovine milk by protease extracted from the latex *Jacaratia corumbensis*. **LWT - Food Science and Technology**, v.

49, n. 1, p. 73–79, 2012.

ABRAS - Associação Brasileira de Supermercados. Disponível em < <https://www.abras.com.br/>> Acesso em 25 de março de 2023.

BANIHASHEMI, S. A. et al. Bioactive peptides fractions from traditional Iranian Koopeh cheese; lactic fermentation products. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 29, n. April, p. 101798, 2020.

BARRACOSA, P. et al. Biochemical diversity of cardoon flowers (*Cynara cardunculus* L.): Predicting PDO Mediterranean cheese textures. **Food Bioscience**, v. 39, n. March 2020, 2021.

BEY, N. et al. The non-edible parts of fennel (*Foeniculum vulgare*) as a new milk-clotting protease source. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 181–187, 2018.

BORAN, O. S.; SULEJMANI, E.; HAYALOGLU, A. A. Acceleration of proteolysis, flavour development and enhanced bioactivity in a model cheese using Kuflu cheese slurry: An optimisation study. **Food Chemistry**, p. 135495, 2023.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRASIL. BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária de Abastecimento. Portaria n° 146, de 7 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial da União, [da República Federativa do Brasil], Brasília, . n. c, p. 1–13, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n° 12 (2001) Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF. **Diário Oficial da União**, v. 2001, p. 5, 2001.

BRITTEN, M.; GIROUX, H. J. Rennet coagulation of heated milk: A review. **International Dairy Journal**, v. 124, p. 105179, 2022.

BRUTTI, C. B. et al. Onopordum acanthium L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. **Lwt**, v. 45, n. 2, p. 172–179, 2012.

CALLAGHAN-PATRACHAR, N. et al. USANS and SANS investigations on the coagulation of commercial bovine milk: Microstructures induced by calf and fungal rennet. **Food Hydrocolloids**, v. 116, n. June 2020, p. 106622, 2021.

CEAGESP. **Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo - CEAGESP.** , 2021.

CHAZARRA, S. et al. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 12, p. 1393–1400, 2007.

CIPOLAT-GOTET, C. et al. From cow to cheese: Novel phenotypes related to the sensory profile of model cheeses from individual cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 7, p. 5865–5877, 2018.

COLOMBO, M. L. et al. Miniature cheeses made with blends of chymosin and a vegetable rennet from flowers of *Silybum marianum*: Enzymatic characterization of the flower-coagulant peptidase. **Food Chemistry**, v. 266, p. 223–231, 2018.

CRUZ, A. G. et al. **Processamento de Produtos Lacteos- Queijos, Leites Fermentados, Bebidas Lácteas, Sorvete, Manteiga, Creme de Leite, Doce de Leite, Soro em Pó e Lácteos Funcionais**. 1ª edition ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltd., 2017. v. III

DE ALCANTARA, M.; DE GRANDI CASTRO FREITAS-SÁ, D. Rapid and versatile sensory descriptive methods - An updating of sensory science. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, p. 1–12, 2018.

DE ALCANTARA, M.; FREITAS-SÁ, D. G. C. Rapid and versatile sensory descriptive methods - An updating of sensory science. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, p. 1–12, 2018.

DE FALCO, B. et al. Artichoke: botanical, agronomical, phytochemical, and pharmacological overview. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 6, p. 993–1018, 2015.

DE FARIAS, V. A. et al. Noni (*Morinda citrifolia L.*) fruit as a new source of milk-clotting cysteine proteases. **Food Research International**, v. 127, p. 108689, 2020.

DE JESUS, J. C. et al. Quick identification of the time of maturation of artisanal minas cheese by ftir-ATR spectroscopy and multivariate techniques. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 10, p. 2000–2011, 2020.

DIAS, G. M. P. et al. Perfil dos peptídeos bioativos obtidos de queijos de coalho com potencial antimicrobiano. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 24, n. 1, p. 1–7, 2019.

DUPAS, C. et al. Plants: A natural solution to enhance raw milk cheese preservation? **Food Research International**, v. 130, p. 108883, 2020.

EL-SALAM, B. A. E.-Y. A.; IBRAHIM, A. E.-H. O.; EL-SAYED RAZEK, H. A. EL. Purification and characterization of milk clotting enzyme from artichoke (*Cynara cardunculus L.*) flowers as coagulant on white soft cheese. **International Journal of Dairy Science**, v. 12, n. 4, p. 254–265, 2017.

EL-TANBOLY, E. S. et al. Utilization of salt whey from egyptian ras (cephalotyre) cheese in microbial milk clotting enzymes production. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 12, n. 1, p. 9–19, 2013.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA**. , 2021.

ESPOSITO, M. et al. Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease. **Food Chemistry**, v. 204, p. 115–121, 2016.

FEIJOO-SIOTA, L. et al. Expression, activation and processing of a novel plant milk-clotting aspartic protease in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 268, p. 28–39, 2018.

FERNANDES, J. Produção de queijo: origem dos coalhos. **Agrotec**, p. 101–103, 2015.

FERNÁNDEZ-SALGUERO, J.; SANJUÁN, E. Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes' milk cheese. **Food Chemistry**, v. 64, n. 2, p. 177–183, 1999.

FIALHO, T. L. et al. Extraction and identification of antimicrobial peptides from the Canastra artisanal minas cheese. **Food Research International**, v. 107, p. 406–413, 2018a.

FIALHO, T. L. et al. Extraction and identification of antimicrobial peptides from the Canastra artisanal minas cheese. **Food Research International**, v. 107, p. 406–413, 2018b.

FURTADO, M. M. **Queijos Semiduros**. 1. ed. São Paulo - Brasil: Setembro Editora, 2019.

GALÁN, E. et al. Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheeses made with sheep milk. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 1, p. 93–98, 2008.

GARCÍA, V. et al. Physicochemical, microbiological, textural and sensory changes during the ripening of pasteurised goat milk cheese made with plant coagulant (*Cynara scolymus*). **International Journal of Dairy Technology**, v. 69, n. 1, p. 96–102, 2016.

GHRIBI, A. M. et al. *Cynara cardunculus* as a potential source of milk coagulating protease: Effects on physical properties of cow's milk. **Food Science and Nutrition**, n. July, p. 1–10, 2022.

GOMES, S. et al. Characterization of *Cynara cardunculus* L. flower from Alentejo as a coagulant agent for cheesemaking. **International Dairy Journal**, v. 91, p. 178–184, 2019.

GONÇALVES, B. H. R. F. et al. Evaluation of the peptide profile with a view to authenticating buffalo mozzarella cheese. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 7, p. 1586–1593, 2016.

GONÇALVES, B. H. R. F. et al. Buffalo mozzarella chemical composition and authenticity assessment by electrophoretic profiling. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 1841–1851, 2017.

GONÇALVES, B. H. R. F. et al. Fast Verification of Buffalo's Milk Authenticity by Mid-Infrared Spectroscopy, Analytical Measurements and Multivariate Calibration. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 7, p. 1453–1460, 2020.

GONZÁLEZ-RÁBADE, N. et al. Production of plant proteases in vivo and in vitro - A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 983–996, 2011.

GOSTIN, A. I.; WAISUNDARA, V. Y. Edible flowers as functional food: A review on artichoke (*Cynara cardunculus* L.). **Trends in Food Science and Technology**, v. 86, p. 381–391, 2019.

GRANDI, T. S. M. **Tratado das plantas medicinais - mineiras, nativas e cultivadas**. 1. ed. Belo Horizonte: Adequatio Estúdio, 2014.

GUEVARA, M. G.; DALEO, G. R. **Biotechnological applications of plant proteolytic enzymes**. 1ª edition ed. Mar del Plata, Argentina: Springer International Publishing, 2018. v. 1

HILL, A. R.; KETHIREDDIPALLI, P. **Dairy Products: Cheese and Yogurt**. Third Edit ed. [s.l.] Elsevier, 2012.

HUPPERTZ, T.; FOX, P. F. Effect of NaCl on some physico-chemical properties of concentrated bovine milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 10, p. 1142–1148, 2006.

IIZUKA, T.; FAUST, R. M. Detection and Characterization of Naturally Occurring Plasmids in *Bacillus cereus* Isolates by Agarose Gel Electrophoresis. **Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University**, v. 60, n. 4, p. 263–274, 1982.

IVENS, K. O. et al. Effect of proteolysis during Cheddar cheese aging on the detection of milk protein residues by ELISA. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 1629–1639, 2017.

KHAN, U. M. et al. Interpreting the production, characterization and antioxidant potential of plant proteases. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 43, 2023.

KHATTAB, A. R. et al. Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. **Trends in Food Science and Technology**, v. 88, n. January, p. 343–360, 2019.

KOCAK, A. et al. Role of using adjunct cultures in release of bioactive peptides in white-brined goat-milk cheese. **Lwt**, v. 123, n. January, p. 109127, 2020.

KONGO, J. M.; MALCATA, F. X. **Cheese: Processing and Sensory Properties**. 1. ed. Porto, Portugal: Elsevier Ltd., 2015.

LAEMMIL, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature Publishing Group**, v. 228, p. 726–734, 1970.

LAMICHHANE, P.; KELLY, A. L.; SHEEHAN, J. J. Symposium review: Structure-function relationships in cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 3, p. 2692–2709, 2018.

LAWLESS, H. T.; HEYMANN, H. **Sensory Evaluation of Food**. [s.l.: s.n.].

LEMES, A. C. et al. A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 217–224, 2016.

LI, Q.; ZHAO, Z. Acid and rennet-induced coagulation behavior of casein micelles with modified structure. **Food Chemistry**, v. 291, p. 231–238, 2019.

LI, Z. et al. Rheological and structural properties of coagulated milks reconstituted in D2O: Comparison between rennet and a tamarillo enzyme (tamarillin). **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 170–178, 2018.

LIBURDI, K. et al. A preliminary study of continuous milk coagulation using *Cynara cardunculus* flower extract and calf rennet immobilized on magnetic particles. **Food Chemistry**, v. 239, p. 157–164, 2018.

LIMA, M. D. S. F. DE et al. Queijo de coalho artesanal: fonte alternativa de peptídeos antimicrobianos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, p. 1–7, 2017.

- LIU, D. et al. Antioxidant activity of peptides in postmortem aged duck meat as affected by cooking and in vitro digestion. **International Journal of Food Properties**, v. 22, n. 1, p. 727–736, 2019.
- LIU, L. et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on the antioxidant activity of Cheddar cheese during ripening and under simulated gastrointestinal digestion. **Lwt**, v. 95, p. 99–106, 2018.
- LIU, X. et al. Advances in research on calf rennet substitutes and their effects on cheese quality. **Food Research International**, v. 149, n. May, p. 110704, 2021.
- LLORENTE, B. E. et al. Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases. **Food Chemistry**, v. 159, p. 55–63, 2014a.
- LLORENTE, B. E. et al. Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases. **Food Chemistry**, v. 159, p. 55–63, 2014b.
- LLORENTE, B. E.; BRUTTI, C. B.; CAFFINI, N. O. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 8182–8189, 2004.
- LUO, J. et al. Characterization and milk coagulating properties of *Cynanchum otophyllum* Schneid. proteases. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 2842–2850, 2018.
- MAZORRA-MANZANO, M. A. et al. Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1902–1907, 2013.
- MEILGAARD, M. C.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 4th. ed. Boca Raton: [s.n.].
- MILLER, H. . SHORT COMMUNICATIONS A Simplified Method for the Evaluation of Antioxidants. **Short Communications**, n. 3831, p. 3831, 1971.
- MINIM, V. P. R.; DA SILVA, R. DE C. DOS S. N. **Análise Sensorial Descritiva**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2016.
- MOHANTY, A. K. et al. Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). **Journal of Dairy Research**, v. 70, n. 1, p. 37–43, 2003.
- MUNIR, M. et al. Effect of sonication, microwaves and high-pressure processing on ACE-inhibitory activity and antioxidant potential of Cheddar cheese during ripening. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 67, p. 105140, 2020.
- NOGUEIRA, L. S. et al. Thermostable trypsin-like protease by *Penicillium roqueforti* secreted in cocoa shell fermentation: Production optimization, characterization, and application in milk clotting. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 5, p. 2069–2080, 2021.
- ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. **Lait**, v. 87, n. 2, p.

149–165, 2007.

ORDIALES, E. et al. Technological characterisation by free zone capillary electrophoresis (FCZE) of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in “torta del Casar” cheese-making. **Food Chemistry**, v. 133, n. 1, p. 227–235, 2012.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos. Alimentos de Origem Animal - Volume 2**. ESpecial ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2005.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos - Alimentos de Origem Animal**. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2005. v. 2

PAULA, J. C. J. DE; CARVALHO, A. F. DE; FURTADO, M. M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à saga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 367/368, p. 19–25, 2009.

PEPE, G. et al. Antioxidant peptides released from gastrointestinal digestion of “Stracchino” soft cheese: Characterization, in vitro intestinal protection and bioavailability. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 494–505, 2016.

PRADO, F. B. et al. Viabilidade Da Produção De Proteases Por Espécies De Aspergillaceae E Triagem De Coagulantes Do Leite Bovino / Feasibility of Protease Production By Aspergillaceae Species and Screening of Coagulants From Bovine Milk. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 16356–16373, 2021.

PRITCHARD, S. R.; PHILLIPS, M.; KAILASAPATHY, K. Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1545–1548, 2010.

PUGLISI, I.; PETRONE, G.; LO PIERO, A. R. A kiwi juice aqueous solution as coagulant of bovine milk and its potential in Mozzarella cheese manufacture. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 1, p. 67–72, 2014.

PURUSHOTHAMAN, K. et al. Aspartic protease-pepstatin A interactions: Structural insights on the thermal inactivation mechanism. **Biochimie**, v. 189, p. 26–39, 2021.

REOLON-COSTA, A.; GRANDO, M. F.; CRAVERO, V. P. Alcachofra (*Cynara Cardunculus* [var. *Scolymus* (L) Fiori]): alimento funcional e fonte de compostos promotores da saúde. **Revista Fitos**, v. 10, n. 4, p. 526–538, 2017.

RICCERI, J.; BARBAGALLO, R. N. Role of protease and oxidase activities involved in some technological aspects of the globe artichoke processing and storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 196–201, 2016.

SCOTCONSULTORIA. **Scot Consultoria**. , 2021.

SIDRACH, L. et al. Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus* L.): Enzymatic properties of cynarase A. **Phytochemistry**, v. 66, n. 1, p. 41–49, 2005.

SILVA, B. L. et al. Production and characterization of a milk-clotting protease produced in

submerged fermentation by the *thermophilic fungus Thermomucor indicae-seudaticae* N31. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 4, p. 1999–2011, 2014.

SILVA, G. M. DE S. et al. Artichoke leaf extracts: Proteolytic activity, coagulant and hplc analysis. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 45, p. 1–13, 2021.

SILVA, R. C. S. N. et al. Optimized Descriptive Profile: A rapid methodology for sensory description. **Food Quality and Preference**, v. 24, n. 1, p. 190–200, 2012.

SMITH, J. P. et al. Quantitation and speciation of residual protein within active pharmaceutical ingredients using image analysis with SDS-PAGE. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 207, p. 114393, 2022.

SOARES, E. F. et al. Potencial do latex da fruta pão (*Artocarpus altilis*) como agente coagulante do leite. **Ciencia Rural**, v. 45, n. 1, p. 149–154, 2014.

SONBOLI, R. et al. Improving SDS-PAGE method for monoclonal antibodies: The advantages of Tris-Acetate over Tris-Glycine SDS-PAGE system and comparison with CE-SDS method. **Protein Expression and Purification**, v. 182, n. February, p. 105845, 2021.

Statistical Analysis System (SAS), Student version; SAS Institute Inc., USA. , 2021.

STONE, H.; SIDEL, J. **Sensory Evaluation Practices**. 3rd. ed. New York: [s.n.].

TABET, R. et al. Effect of vegetable coagulant and lamb rennet on physicochemical composition, fatty acid profile and lipid quality indices of a traditional fresh cheese (Jben). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 47, n. January, p. 102609, 2023.

TAHIR, H. E. et al. Rapid prediction of phenolic compounds and antioxidant activity of Sudanese honey using Raman and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 226, p. 202–211, 2017.

TENGILIMOGLU-METIN, M. M.; KIZIL, M. Reducing effect of artichoke extract on heterocyclic aromatic amine formation in beef and chicken breast meat. **Meat Science**, v. 134, p. 68–75, 2017.

TIMÓN, M. L. et al. Identification of radical scavenging peptides (<3kDa) from Burgos-type cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 359–365, 2014.

TIMÓN, M. L. et al. Antioxidant peptides (<3 kDa) identified on hard cow milk cheese with rennet from different origin. **Food Research International**, v. 120, p. 643–649, 2019.

TITO, F. R. et al. Determination and characterisation of milk-clotting activity of two *Solanum tuberosum* aspartic proteases (StAPs). **International Dairy Journal**, v. 104, p. 104645, 2020.

TOLDRÁ, F. et al. Generation of bioactive peptides during food processing. **Food Chemistry**, v. 267, p. 395–404, 2018.

TOMASZEWSKA-GRAS, J. et al. Behaviour of water in different types of goats' cheese. **International Dairy Journal**, v. 95, p. 18–24, 2019.

TRAN DO, D. H.; KONG, F. Texture changes and protein hydrolysis in different cheeses under

simulated gastric environment. **Lwt**, v. 93, p. 197–203, 2018.

VÉLEZ, M. A. et al. Influence of cheese making technologies on plasmin and coagulant associated proteolysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 282–288, 2015.

VERÍSSIMO, P. et al. Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus L.* **European Journal of Biochemistry**, v. 235, n. 3, p. 762–768, 1996.

WANG, X. et al. Label-free quantitative proteomic analysis of the biological functions of *Moringa oleifera* seed proteins provides insights regarding the milk-clotting proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 325–333, 2020.

WOLFSCHOON-POMBO, A.; DE LIMA, A. Extensão e profundidade de proteólise em queijo Minas Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios de Cândido Tostes**, v. 44, n. 261, 1989.

ZAYED, A.; FARAG, M. A. Valorization, extraction optimization and technology advancements of artichoke biowastes: Food and non-food applications. **Lwt**, v. 132, p. 109883, 2020.

ZIKIOU, A. et al. Algerian cardoon flowers express a large spectrum of coagulant enzymes with potential applications in cheesemaking. **International Dairy Journal**, v. 105, p. 1–8, 2020.

ZIKIOU, A.; ZIDOUNE, M. N. Enzymatic extract from flowers of Algerian spontaneous *Cynara cardunculus*: Milk-clotting properties and use in the manufacture of a Camembert-type cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 72, n. 1, p. 89–99, 2019.

CAPÍTULO II: Objetivos

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Caracterizar o coagulante vegetal obtido da flor da alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *Scolymus*) e avaliar sua influência na produção e maturação do queijo como uma alternativa à quimosina microbiana.

1.2 Objetivos Específicos

Obter e caracterizar o extrato vegetal das flores da alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*), flores do cardo (*Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris*) e quimosina microbiana;

- Avaliar a estabilidade ao armazenamento sob congelamentos dos extratos vegetais e quimosina microbiana durante 0, 30, 60, 90 e 120 dias;

- Produzir queijos utilizando três tipos de coagulantes (extratos das flores de *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*; extrato de *Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris* e quimosina microbiana);

- Avaliar os queijos produzidos por meio de sua composição química, propriedades físico-químicas, de textura, e perfil proteico (SDS-PAGE), com 1 dia de produzido e nos tempos de maturação 10, 20 e 30 dias;

- Caracterizar os queijos produzidos sensorialmente aplicando Perfil Descritivo Otimizado (PDO) nos tempos 10, 20 e 30 dias de maturação;

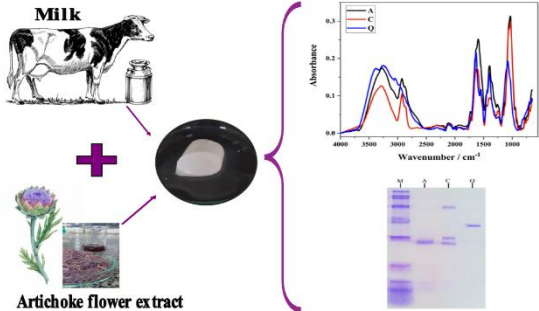
- Avaliar os peptídeos solúveis em água extraídos dos queijos com 1 dia de produzido e nos tempos de maturação 10, 20 e 30 dias por SDS-PAGE, RP-HPLC, capacidade antioxidante e antibacteriana.

CAPÍTULO III: Artigo I - Proteomic characterization of aspartic protease from artichoke flower (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*) using MIR spectroscopy and analytical measurements.

Artigo publicado no Journal of the Brazilian Chemical Society

Graphical Abstract (GA)

GA Figure:



GA Text: Use of artichoke flower protease in milk coagulation.

Chemical characterization of aspartic protease from artichoke flower (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*) using MIR spectroscopy and analytical measurements

Josane C. de Jesus,^a Lucas C. C. Reis,^b Mateus P. F. Santos,^c Leandro S. Santos^a and Sibelli P. B. Ferrão^{,a}*

^aPrograma de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Rodovia BR 415, km 03, s/n, 45700-000 Itapetinga-BA, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Trevo Rotatório Professor Edmir Sá, 37203-202 Lavras-MG, Brazil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Biologia e Biotecnologia de Microorganismos, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rodovia Jorge Amado, km 16, 45662-900 Ilhéus-BA, Brazil.

*e-mail: sibpass@yahoo.com.br

Orcid: <http://orcid.org/0000-002-5700-7882>

Orcid: <http://orcid.org/0000-0001-7431-318X>

Abstract

Vegetable proteases have been studied as milk coagulants, and artichoke flower (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*) has potential coagulant action as a substitute for microbial chymosin. The objective was to perform chemical characterization of aspartic proteases from artichoke flower (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*) by mid-infrared spectroscopy (MIR) and analytical measurements. Artichoke flower extracts were obtained and crude thistle flower extract and microbial chymosin were used as a reference. Plant extracts and microbial chymosin were analyzed for protein concentration, proteolytic activity (PA), milk clotting activity (MCA), specificity ratio (SR), effects of pH, temperature, NaCl and CaCl₂ concentration on MCA and PA, characterization by electrophoretic, spectroscopic, chromatographic and storage stability. The results indicated that the crude extract of artichoke flower showed high MCA (510.08 SU mL⁻¹), low PA (10.50 µg mg⁻¹), SR (48.57) and storage stability for up to 90 days under frozen. The electrophoretic profile of artichoke flower resulted in a protein band with an apparent molecular weight of 32 kDa, associated with cardosin A. Artichoke flower may be a new alternative for commercial plant proteases with active enzymes for milk coagulation.

Keywords: cardosines, enzyme, infrared, milk coagulation, peptidase, rennet.

Introduction

Chymosin (EC3.4.23.4) is one of the main aspartic proteases, the oldest and best known in cheesemaking due to its high specificity to cleave the κ-casein bond (Phe₁₀₅-Met₁₀₆) and is therefore considered the best milk coagulant.¹⁻⁴ However, over the years the supply of this coagulant from animal sources has decreased and the main reasons involve the complexity in the process of extracting and purifying the enzymes from the stomach of calves and other reasons such as religious reasons (e.g., Judaism and Islam), diet (lactovegetarians), making the supply of the enzyme very laborious and expensive. Because of this, new sources of proteases from microorganisms and/or plants with properties that adequately satisfy the cheese industry are important.⁵⁻⁷

In recent years, most of the commercial rennet used in the cheese industry comes from microbial proteases due to the easy cultivation and high productivity of the enzyme. However, plant proteases have attracted attention because of the abundance of plant resources, the convenience of extraction, and the differentiated organoleptic characteristics of cheese appreciated by consumers. In addition, there is a consumer concern regarding genetically modified foods such as recombinant chymosin which is an enzyme preparation obtained from genetically modified microorganisms.⁸⁻¹⁰

Plant proteases as obtained from *Moringa oleifera* seed,¹⁰ *Artocarpus altilis* latex,¹¹ *Morinda*

citrifolia L.,¹² and *Solanum tuberosum* turbot¹³ are examples of possible alternatives for milk coagulation. According to Gomes *et al.*,¹⁴ some of these plant proteases are highly proteolytic and perform nonspecific hydrolysis of milk caseins, influencing the texture, sensory quality, and the yield of cheese, have a low coagulation activity/milk proteolytic activity ratio, also known as the specificity ratio, and are therefore not suitable for use in the manufacture of some cheeses.

The most commonly used plant coagulants in commercial cheese production are aqueous extracts of thistle flowers (*Cynara cardunculus* L.), used for many years on the Iberian Peninsula to make artisan cheeses from goat and sheep's milk.¹⁵ Thistle flower is a plant that grows spontaneously and is found in abundance in dry, stony and uncultivated soils. Over the years this plant has been characterized in terms of its milk coagulation properties by proteases and the enzymatic composition of the thistle flower can vary according to the ecotypes of the plants and can influence the characteristics of cheeses.^{14,16} These extracts are mainly composed of the proteases, cardosin A and cardosin B, which are characterized by high coagulation activity and strong proteolytic activity, leading to the production of cheeses with a creamy, soft texture, a characteristic aroma and a slightly piquant and bitter taste.¹

Cynara cardunculus L. var *scolymus*, popularly known as artichoke flower, is cultivated mainly for food purposes. It is a plant native to southern Europe, the Mediterranean region, and has been spread worldwide.¹⁷ Appreciated for its bitter-sweet flavor given by the edible inflorescence, it has not been used in other applications. Its use as a coagulant in milk for cheese production can be an economically viable alternative for cheese makers and can add value to the product.^{18,19}

Although artichoke is a source with potential application in cheese production, there is little information in the literature about the study and characterization in relation to protein concentration, PA, MCA, specificity ratio, effects of pH, temperature, concentration of CaCl₂ and NaCl on PA and MCA, characterization by electrophoresis and chromatography. In addition, no studies related to spectroscopic characterization by MIR were found. In this sense, the present study aimed to carry out the chemical characterization of aspartic proteases from the artichoke flower (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*) using MIR spectroscopy and analytical measurements.

Experimental

Samples

Mature artichoke flowers (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*) were acquired from plants grown in the São Roque region (São Roque, São Paulo, Brazil). As reference were utilized mature flowers of the thistle (*Cynara cardunculus* L. var *sylvestris*) obtained from plants grown in the Alto do Alentejo region (Campo Maior, Portugal) and microbial rennet (*Aspergillus niger* var *awamori*) (HÁ-LA[®], Brazil, Chr. Hansen) acquired in the local trade. The skim milk powder was obtained

from Laticínios Bela Vista Ltda. (Goiás, Brazil).

Preparation of coagulant extracts

The artichoke and thistle flower pistils were dried for about 30 days at 25 °C and protected from light. After this period, they were used to prepare aqueous extracts of artichoke and thistle flowers.¹⁴ The pistils (35 g) were macerated in a mortar and added to 0.5 L of distilled water. This mixture was left to rest for 24 h at 25 °C in the dark. The homogenized extracts were filtered in quantitative filter paper (Unifil, C40, 18.5 cm) and used on the same day.²⁰

Determination of protein concentration

The protein concentration was determined according to the Coomassie Blue dye binding method,²¹ using bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) as a standard. Proteins were detected by measuring the absorbance at 595 nm in a spectrophotometer (Shimadzu UV-1800, Duisburg, Germany).

Determination of PA

The PA of the crude plant extracts and microbial chymosin was determined using a modified method of Mohanty *et al.*²² The substrate was prepared by dissolving 1% (w/v) total casein (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) in 10 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer (pH 6.5). The assay was performed by incubating 1 mL of substrate with 100 µL of crude plant extract or microbial chymosin at (37 ± 1 °C) in a thermostatic bath (Tecnal, model Te-184, São Paulo, Brazil) for 30 min. The reaction was stopped by the addition of 3 mL of trichloroacetic acid (TCA, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) at 6.5% (w/v), the solution was centrifuged (centrifuge, MPW – 350, Warsaw, Poland) at 5000 x g for 20 min at room temperature (25 ± 1 °C). For the blank assay, substrate was added after inactivation of the enzyme by TCA. The absorbance of the supernatant was measured at 280 nm using a spectrophotometer (Shimadzu UV-1800, Duisburg, Germany). To evaluate proteolytic activity, a standard curve was constructed by measuring the absorbance at 280 nm of serial dilutions of 100 µg mL⁻¹ of L-Tyrosine solution (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA). One unit of enzyme activity (U) (equation 1) was defined as the amount of enzyme required to produce 1.0 µmol of L-tyrosine equivalent in 1 mL of reaction medium per minute. The specific activity was expressed in units of enzyme activity per µg protein by the ratio of the activity to the concentration of protein in the extract.

$$U/mL = \frac{(\mu g/mL \text{ tyrosine equivalent} \times \text{dilution factor})}{(\text{Enzyme volume used} \times \text{time (min)})} \quad (1)$$

Effect of pH, temperature, NaCl and CaCl₂ concentration on PA

The effect of pH on PA was determined by mixing and incubating the crude plant extracts (artichoke and thistle) and microbial chymosin with the bovine casein substrate (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) at a concentration of 1% (w/v) at 37 ± 1 °C for 30 min. Different pH values were used: sodium acetate 0.05 mol L⁻¹ (pH 5.0); sodium phosphate 0.05 mol L⁻¹ (pH 5.5, 6.0 and 6.5) and Tris-HCl 0.05 mol L⁻¹ (pH 7.0 and 8.0) at 37 ± 1 °C.

The effect of temperature on PA was determined at temperatures 30, 40, 50, 60, 70 and 80 ± 1 °C in a thermostat bath (Tecnal, model Te-184, São Paulo, Brazil) for 30 min at pH 6.5. To determine the effect of NaCl and CaCl₂ concentration, NaCl concentrations (0, 100, 250, 500 and 1000 mmol) and CaCl₂ (0, 10, 40, 70 and 100 mmol) were used at 37 ± 1 °C and pH 6.5. The proteolytic activity was determined according to the topic determination of PA.

Determination of MCA

The MCA of the crude plant extracts and microbial chymosin were determined using modified method of Luo *et al.*²³ 1 mL of the substrate (12% skim milk in 10 mmol CaCl₂, pH 6.5) was incubated at 37 ± 1 °C in a thermostatic bath (Tecnal, model Te-184, São Paulo, Brazil) for 5 min, then 100 µL of the plant extracts and microbial chymosin were added. The time from the addition of the enzyme to the first appearance of solid material was measured in seconds and defined as coagulation time. The MCA was expressed in Soxhlet units (SU). The SU represents the volume of milk that can be coagulated by one volume unit of the enzyme extract in 40 min at 37 ± 1 °C and pH of 6.5. The SU were measured using equation 2.

$$MCA (SU/mL) = \frac{(2400 \times V)}{(t \times v)} \quad (2)$$

Where: 2400 is the 40 min clotting time in seconds; V is the volume of milk (mL); v, the volume of enzyme (mL); and t, the coagulation time in seconds.

Effect of pH, temperature and NaCl and CaCl₂ concentration on MCA

The effect of pH on MCA was tested using the crude plant extracts (artichoke and thistle) and microbial chymosin at 37 ± 1 °C in a thermostat bath (Tecnal, model Te-184, São Paulo, Brazil). The pH of the milk was adjusted using 10 mmol L⁻¹ of sodium acetate buffer (pH 5.0), sodium phosphate (pH 5.5, 6.0 and 6.5) and Tris-HCl (pH 7.0 and 8.0). The effect of temperature was determined at 30 to 80 ± 1 °C in a thermostat bath (Tecnal, model Te-184, São Paulo, Brazil) at 10 °C intervals. To determine the effect of CaCl₂ and NaCl concentration, the concentration of

CaCl₂ was varied from 10 to 100 mmol and NaCl from 100 to 1000 mmol. The MCA was measured at pH 6.5 and temperature of 37 ± 1 °C. The effect of milk clotting activity was determined according to the topic determination of MCA.

Determination of SR

The milk specificity ratio of the crude plant extracts and microbial chymosin is the ratio of MCA to PA and was determined according to equation 3.²⁴

$$SR = \frac{MCA}{PA} \quad (3)$$

Electrophoretic, spectroscopic and chromatographic characterization

Electrophoretic characterization

SDS-PAGE electrophoresis was performed on polyacrylamide gel. The stacking gel concentration was 4% and the separation gel concentration was 12% according to Laemmli.²⁵ Crude plant extracts (artichoke and thistle) and the microbial chymosin were used. Aliquots of 10 µL were transferred to the gels and runs performed at 4 °C for 150 min at 250 V, 30 mA and 15 W (Apelex PS 304 MinipacII, France). The following were used as molecular weight standards: Myosin (200.0 kDa), β-galactosidase (116.2 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45.0 kDa), carbonic anhydrase (31.0 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa), lysozyme (14.5 kDa, but with apparent molecular weight of 15.5 kDa), and aprotinin (6.5 kDa) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After the run, the proteins were stained using 0.1% (w/v) Coomassie Blue G-250 (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) and destained with a 30% (v/v) solution of ethanol (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) and 7.5% (v/v) acetic acid (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), then the gels were scanned. The molecular weights of the gel-migrated proteins were determined accordingly Iizuka and Faust.²⁶

Spectroscopic characterization - MIR

The plant extracts and the freeze-dried microbial chymosin were analyzed in a mid-infrared, FTIR-ATR equipment (Cary 630 FTIR, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), equipped with attenuated total reflectance (ATR) with diamond crystal cell. Then 0.5 g of the samples were placed individually on the accessory compartment where the rays in the infrared range (diamond crystal) hit. The spectra were obtained in absorbance mode with a resolution of 4 cm⁻¹ and 64 scanning scans. The software for acquisition of the spectra was the Agilent MicroLab PC software. Before each collection the background spectrum was read and evaluated in the spectral region with a wavenumber of 4000 to 600 cm⁻¹ for each sample two repetitions were

performed, and the room temperature was maintained at around 25 °C.

Chromatographic Characterization

The crude extracts of artichoke flower, thistle flower and the microbial chymosin dialyzed at 4 °C were loaded onto a SRT-C SEC 150 Å molecular exclusion column, MW range 500 ~ 150000 (Delaware Technology Park, USA) (4.6 x 300 mm, 5 µm), coupled to a pre-column (ZORBAX SB-C 18, 4.6 mm ID x 12.5 mm, 5 µm), connected to the Agilent 1260 Infinity II HP system. A 5 µL aliquot of the sample was injected and proteins were separated by isocratic elution using 20 mmol sodium phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 0.2 mL min⁻¹ with an analysis time of 30 min. Detection of the proteases was performed at 215 nm on a UV detector. The molecular weights proteins were determined accordingly Iizuka and Faust.²⁶

Storage stability

To evaluate storage stability, the proteolytic activity of the coagulant extracts of artichoke and cardoon flowers, and the microbial chymosin were evaluated on the first day they were obtained and after the storage at -18 °C for 30, 60, 90, and 120 days. The proteolytic activity was evaluated according to the topic determination of PA.

Experimental design

The plant extracts were prepared in three repetitions. Assays were performed in triplicate in a completely randomized design. To evaluate the effect of temperature and pH on PA and MCA, two factorial 3x6 schemes were performed. The coagulant factor was used for all factorials and presented 3 levels (artichoke extract, thistle extract and microbial chymosin) and the factors temperature (30, 40, 50, 60, 70 and 80 °C) and pH (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 and 8.0) presented 6 levels.

The effect of NaCl and CaCl₂ concentration on PA and MCA was evaluated in two 3x5 factorial scheme. The coagulant factor was used for all factorials and presented 3 levels and the factors NaCl concentration (0, 100, 250, 500 and 1000 mmol) and CaCl₂ concentration (0, 10, 40, 70 and 100 mmol) presented 5 levels. For storage stability, a 3 x 5 factorial scheme was used, with 3 coagulants x 5 storage times (0, 30, 60, 90 and 120 days). Analysis of variance (ANOVA) was performed to evaluate the effect of treatments on PA, MCA. The independent effects of the coagulants, as well as the interaction between the factors, were also evaluated. A regression was performed at 5% significance level using the Statistical Analysis System (SAS) statistical software program, Student version 9.1.²⁷

Results and Discussion

Characterization

Protein content, PA, MCA and SR were determined for crude artichoke extract, crude thistle flower extract and microbial chymosin (Table 1).

Table 1. Protein content, specific proteolytic activity, milk clotting activity and specificity ratio for artichoke, thistle and chymosin coagulants (mean \pm standard deviation).

Characterization	Artichoke extract	Thistle extract	Microbial chymosin
Protein concentration (mg mL ⁻¹)	2.05 ^a \pm 0.01	1.79 ^a \pm 0.09	0.68 ^b \pm 0.03
PA (μ g mg ⁻¹)	10.50 ^a \pm 0.22	14.15 ^a \pm 0.97	41.14 ^b \pm 0.02
MCA (SU mL ⁻¹)	510.08 ^a \pm 0.38	558.92 ^b \pm 0.92	1090.66 ^c \pm 0.35
SR	48.57 ^a \pm 1.24	39.49 ^b \pm 0.93	26.51 ^c \pm 0.97

Means with the same letter in the same row did not differ significantly ($p < 0.05$). PA: proteolytic activity; MCA: clotting activity; SR: specificity ratio; Soxhlet Units (SU): volume of milk (mL) that can be coagulated by one-unit volume of enzyme extract.

The protein content was higher and the PA was lower for both vegetable coagulants ($p < 0.05$). For a protease to be considered ideal for cheese production, it must have low PA and high MCA, which was found in the present study for artichoke extract.²⁸

The MCA of the crude artichoke flower extract was lower than that of the crude thistle extract and the microbial chymosin, and one of the factors that can explain this occurrence is probably the lower concentration of coagulation enzymes present in the crude artichoke flower extract. It should be considered that the artichoke and thistle flowers are of different varieties, which may influence the proteases present.

Some factors can interfere in the characteristics of the plant extract, influencing the concentration of coagulation enzymes and, consequently, in the coagulation properties of the milk, such as: form of maceration, temperature of drying of the pistils, variety of flowers, geographical location, stage of ripeness of the flowers at harvest, or even differences in the enzyme profile.¹⁸

The specificity ratio is used as an index to evaluate the suitability of an enzyme extract for use as a coagulant in cheese making.²⁸ The crude artichoke flower extract showed a specificity ratio of 48.57, while the thistle extract and microbial chymosin showed 39.49 and 26.51, respectively. El-

Salam *et al.*⁹ found a value of 103.27 in his studies of purification and characterization of the clotting enzyme from milk from artichoke flowers.

Chymosin is considered the best milk coagulant due to its high specificity, i.e., it has high MCA and low PA, which results in a high specificity ratio, which is the enzyme's ability to hydrolyze κ -casein specifically, and this characteristic is what makes it suitable and most used as a coagulant for cheese production.²⁹

A new coagulant to be considered ideal as a replacement for chymosin should have SR equal to or greater than chymosin. Thus, it can form a curd with high yield and low bitterness in the cheese.⁵

Generally, chymosin has a higher SR than most plant coagulants, but in the present study the plant extracts had higher values.^{3,13,30} This result suggests that the plant proteases present in the artichoke flower may exhibit specific coagulant activity and without excessive hydrolysis of other proteins. Amira *et al.*³¹ evaluated the SR of flowers of *Cynara cardunculus* var. *sylvestris* and found similar result, where plant extract showed higher value of specificity ratio than chymosin. It was also reported by Silva *et al.*,²⁹ SR in *quixaba latex* (5731) surpassed chymosin (3363).

The high specificity ratio exhibited by the crude artichoke flower extract, along with its ability to produce milk curd (MCA), make this coagulant useful as a new substitute for microbial chymosin. Llorente *et al.*⁸ in their studies confirm this result by producing Gouda cheese with artichoke extract, coagulating the milk in about 30 min, an adequate time for use on an industrial scale.

Effects of pH, temperature and concentration of NaCl and CaCl₂ on PA

The interaction between the tested factors (coagulant/pH and temperature) had a significant effect on the proteolytic activity and a quadratic model was fitted ($p < 0.05$). To assess the adequacy of the model, the lack of fit was analyzed, which was not significant indicating that the chosen model is adequate to explain the proteolytic activity as a function of the analyzed treatments. Figure 1 shows the effect of pH and temperature on proteolytic activity, coefficient of determination (R^2) and estimated regression model.

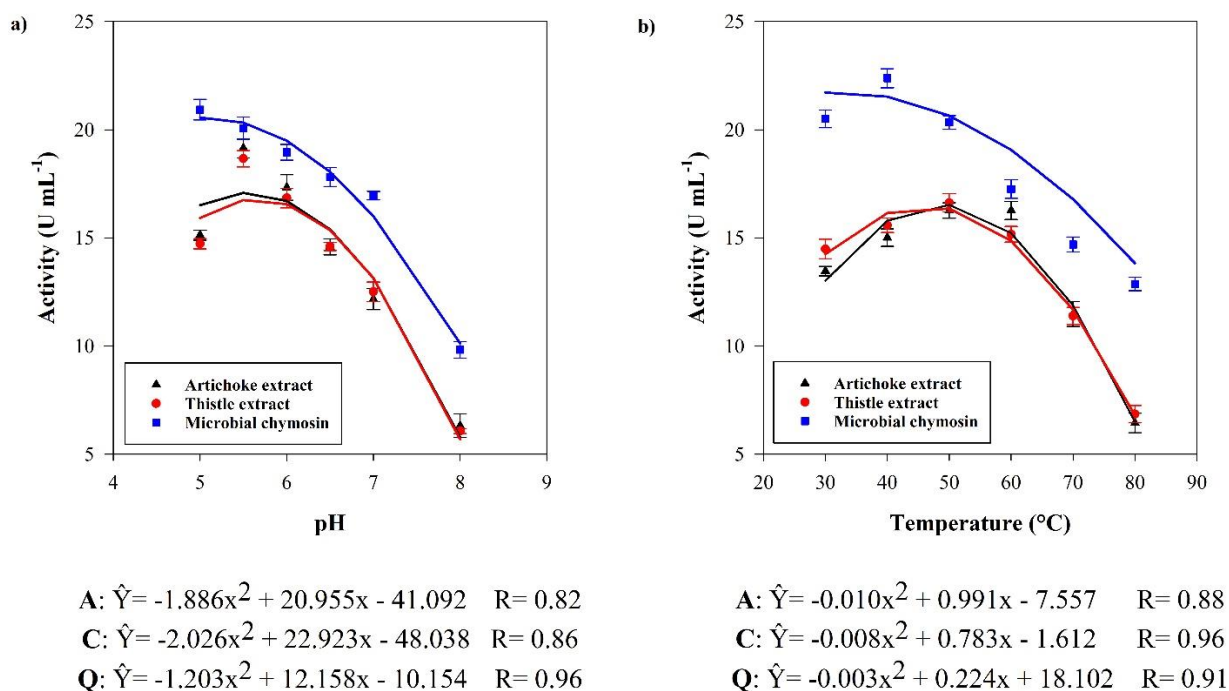


Figure 1 - Effect of pH (a), temperature (b) on proteolytic activity (U), fitted model and coefficient of determination (R^2). Experimental data (▲ ● ■) and model data (line).

The effect of pH on PA of crude artichoke flower extract can be seen in Figure 1a. Coagulants showed similar effects with pH variation.

To obtain the optimal pH value with the highest proteolytic activity, the model obtained for PA was derived. The crude extract of artichoke flower showed optimal PA (17.08 U mL^{-1}) at pH 5.5, similar to the thistle extract (16.75 U mL^{-1}). The microbial chymosin showed optimal activity at pH 5.0.

Determining the effect of temperature on PA is considered an important measure, because it is from this that information can be obtained about the optimal temperature that promotes maximum proteolytic activity.

In Figure 1b, it is possible to verify the loss of activity with the increase in temperature. After model derivation, crude artichoke flower extract (16.55 U mL^{-1}) showed optimal PA at $48.6 \text{ }^\circ\text{C}$ and crude thistle extract (16.59 U mL^{-1}) at $48.9 \text{ }^\circ\text{C}$. Temperatures above this value, the proteases significantly lost their activity. This reduction in activity may be related to enzyme denaturation at temperatures above $60 \text{ }^\circ\text{C}$. These results agree with El-Salam *et al.*,⁹ who, when performing artichoke extract PA, observed that at temperatures above $65 \text{ }^\circ\text{C}$ there is a decrease in PA. The microbial chymosin PA reached a maximum value of 21.48 U mL^{-1} at $30.5 \text{ }^\circ\text{C}$.

According to de Farias *et al.*,¹² vegetable proteases commonly exhibit high proteolytic

activity at higher temperatures, when compared to chymosin. The high PA presented by plant extracts at a temperature of 50 °C is not desirable from a technological point of view, because during the processing of cheese in the coagulation phase it can cause excessive breakage of casein, resulting in a fragile curd with a low technological content.

In addition, low molecular weight peptides are released, which can affect the flavor and texture of cheeses, resulting in an excessively acidic and bitter taste.¹²

Sodium and calcium ions play an important role in the cheese making process, and thus the determination of the effects on PA caused by these solutes are important. The concentration of CaCl₂ and NaCl did not influence the PA ($p > 0.05$).

The contents of NaCl and CaCl₂ can potentiate the enzymatic activity, however, the concentrations studied are not enough to increase the PA.

Effects of pH, temperature and NaCl and CaCl₂ concentration on MCA.

Coagulation is a fundamental step in the transformation of milk into cheese, involving the use of coagulants and depending on several parameters (milk composition, coagulant enzyme, pH, temperature, concentration of NaCl and CaCl₂).

Based on the experimental values, it was observed that there was an interaction between the coagulants and the treatments studied ($p < 0.05$). A first-order model was fitted for the effect of pH on MCA and second-order models were fitted to assess the effect of temperature, NaCl and CaCl₂ concentration on MCA. Figure 2 shows the effect of pH, temperature, NaCl and CaCl₂ concentration on the MCA, coefficient of determination and estimated regression model.

The MCA of proteases from artichoke flower crude extract, thistle and microbial chymosin showed a decreasing linear effect (Figure 2a) with high activity at pH 5.0. The increase in pH was accompanied by a gradual loss of milk clotting activity. At pH 7.0 the activity was completely lost, confirming the results obtained in the PA tests, in which plant extracts and chymosin are more active at acidic pH.

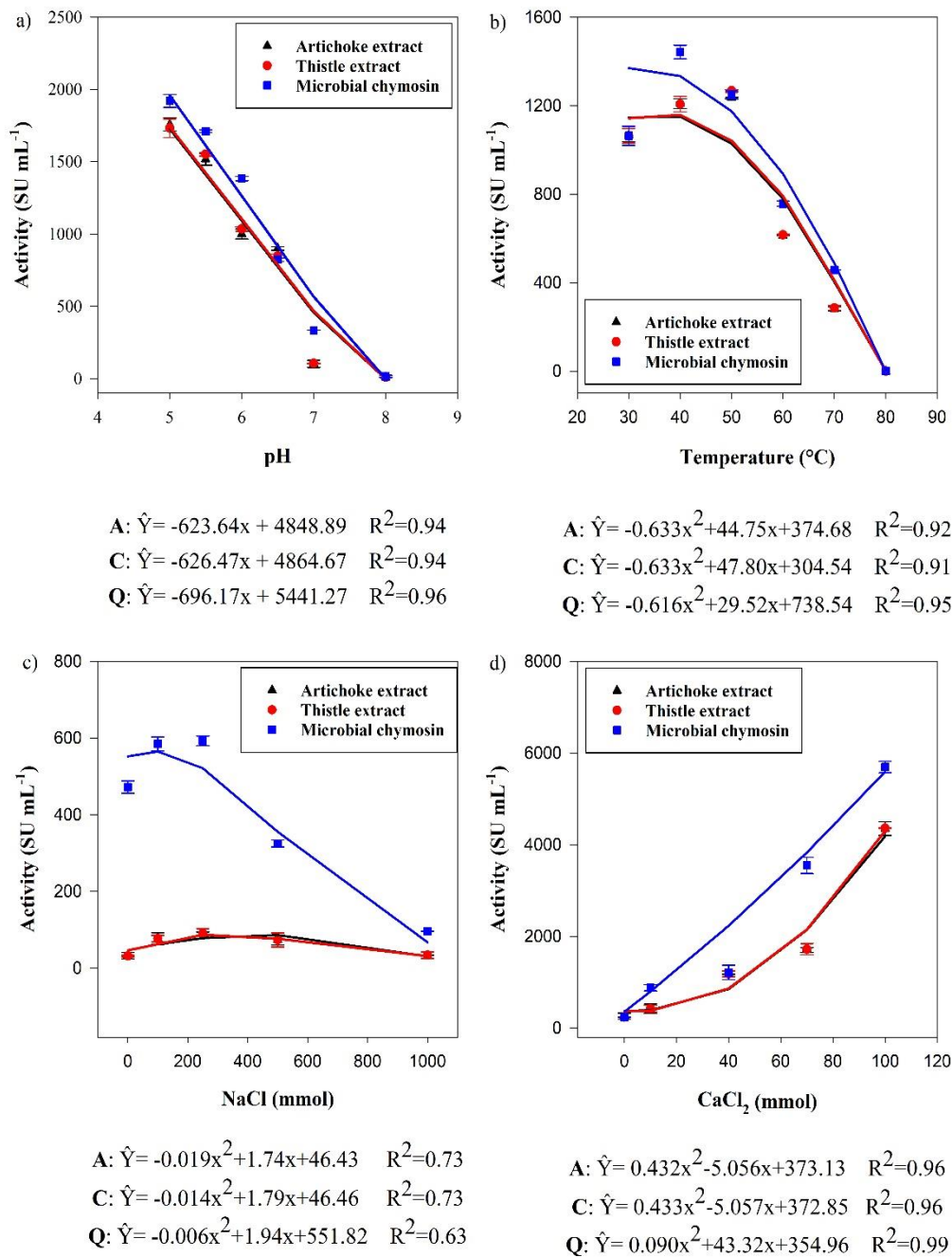


Figure 2. Effects of pH (a), temperature (b) and concentration of NaCl (c) and CaCl₂ (d) on MCA, fitted model and coefficient of determination (R^2). Experimental data (▲ ● ■) and model data (line).

Considering the effect of temperature on the coagulation activity of milk (Figure 2b), it was possible to observe a quadratic behavior ($p < 0.05$) for the three coagulants. From the derivation of the model obtained, it was verified that the coagulants exhibited maximum activity at a temperature of 35 °C, a behavior different from the results obtained for the influence of temperature on PA. The increase in temperature resulted in a decrease in coagulation, losing activity.

Temperatures above 70 °C cause the denaturation of whey proteins, especially β -lactoglobulin. From this denaturation, there is the interaction of the -SH group of denatured β -lactoglobulin with κ -casein, by a disulfide bond, forming a complex of κ -casein with the whey protein, which decreased the effective concentration of κ -casein in the substrate, affecting the action of rennet, reducing coagulation.³² This interaction results in a brittle curd and reduced manufacturing yield due to the loss of fines, which are microscopic pieces of curds lost in the whey.

The increased temperature also causes the calcium and phosphate to transfer from the soluble phase into the colloidal phase of the milk. This shift in the mineral balance contributes to an increase in the coagulation time of the milk, resulting in lower MCA.³³

The effect of sodium chloride concentration on clotting activity showed similar behavior among plant extracts, in chymosin it was found that a reduction in MCA with increasing NaCl concentration (Figure 2c). The crude extract of artichoke flower showed MCA of 46.43 SU mL⁻¹ when tested without addition of salt, with 500 mmol it showed maximum activity of 98.62 SU mL⁻¹, and at the concentration of 1000 mmol it showed MCA of 30.83 SU mL⁻¹. These results indicate that at adequate concentrations, NaCl, in association with the studied extract, maximizes the coagulation of milk.

According to Chazarra *et al.*,³⁴ the addition of NaCl to milk promotes the dissociation of calcium and phosphate from the casein micelles and in solution, affecting the colloidal state of the milk and also the coagulant action. At proper concentration NaCl, decreases the pH of the milk, increases the hydration of casein and leads to a reduction in the zeta potential of the milk, decreasing the coagulation time, resulting in high MCA.³⁵ The increase in NaCl concentration leads to an increase in the ionic strength of the milk, resulting in greater protein-protein interaction, decreasing its solubility in aqueous medium, by the *salting-out* effect, resulting in decreased enzyme action and thereby increasing coagulation time and consequently reducing MCA.

The CaCl₂ concentration influenced the milk coagulation activity, with the highest activity occurring at the 100 mmol concentration for all three coagulants tested (Figure 2d). The addition of calcium chloride to milk increases the concentration of calcium in its ionic form (Ca²⁺) and also of colloidal calcium phosphate, causing a slight decrease in the pH of the milk due to the reaction of some Ca²⁺ ions with the sodium phosphate salts, releasing H⁺.³²

Milk coagulation occurs in two phases, the enzymatic and non-enzymatic phases, also called the secondary phase, in which the aggregation of para-k-casein and macropeptides occurs by association with Ca²⁺ ions, resulting in the formation of para-k- caseinate or curd.³² As a result, an increase in MCA was observed with an increase in CaCl₂.

Electrophoretic, spectroscopic and chromatographic characterization

Electrophoresis

SDS-PAGE analysis was performed to visualize and detect proteins present in the crude extract of artichoke flowers. Electrophoretic patterns of crude artichoke flower extract resulted in a protein band with an apparent molecular weight of 32 kDa (Figure 3). This band probably corresponds to the protease cardosin A.³⁶

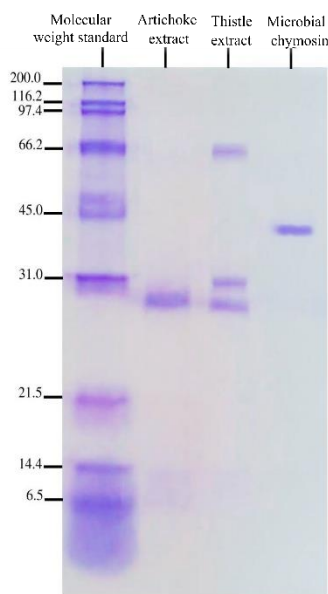


Figure 3. SDS-PAGE electrophoresis of crude artichoke flower extracts, thistle flower and microbial chymosin.

The crude extract of the thistle flower showed an electrophoretic pattern with 3 protein bands (69 kDa, 35 kDa and 32 kDa).^{37–39} The band with an apparent molecular weight of 69 kDa, indicates that probably the thistle flower has a less developed stage of maturation than the artichoke flower. The proteases present in the flowers of the genus *Cynara cardunculus* L. have active proteases called cardosin A and cardosin B.

Cardosin A is expressed mainly as procardosin A with a molecular weight of 64 kDa in the immature flower, but as the flower matures, procardosin A undergoes a sequence of modifications by proteolytic cleavage, resulting in mature cardosin A. This cardosin has two chains, a heavy and a light chain linked together via hydrophobic interactions and hydrogen bonds. Cardosin B is synthesized as a single-chain precursor and proteolytic modifications take place to generate the mature two-chain form.³⁷

According to Alavi and Momen,³⁷ the crude extract of flowers of the genus *Cynara* contains approximately 75% of cardosin A and 25% of cardosin B. The artichoke flower, belonging to the

genus *Cynara*, presented an intense band (32 kDa) associated with cardosin A. Cardosin B was not visualized.

This result indicates that artichoke flowers produced in Brazil have only the protease characteristic of cardosin A, indicating that the flower production region and cultivation conditions can influence the presence of enzymes. This result differs from that found by Llorente *et al.*,³⁶ who, when purifying and characterizing the artichoke extract, found two protein fractions with molecular weights of 31 and 34 kDa and de Sidrach *et al.*,⁴⁰ who found three cardosin enzymes A, B and C when purifying enzymes from artichoke flower.

It is important to emphasize that the crude extract of artichoke flower showed band associated with cardosin with greater intensity, that is, more apparent when compared to the crude extract of thistle flower. The presence of cardosines, in their respective concentrations, generated similar proteolytic and coagulant activities. This result may be associated with the presence of the same types of proteins in plant extracts.

Spectroscopy

The MIR was used in order to obtain information about the structure and molecular vibrations, as well as the chemical composition of the crude extract of the artichoke flower. From the MIR spectra of the plant extracts and chymosin, 6 absorption peaks were observed (Figure 4) related to the vibrations of functional groups that correspond to the asymmetric stretching of the methylene group (C-H) at 3245 and 2926 cm^{-1} , angular deformation in the plane of the Amide II (C-N and N-H) at 1591 cm^{-1} , deformation of the methylene group (C-H) at 1394 cm^{-1} , stretching of the carbonyl group (C-O) at 1265 and 1034 cm^{-1} . The Amide related peak describes the behavior of the secondary structure of the proteins.

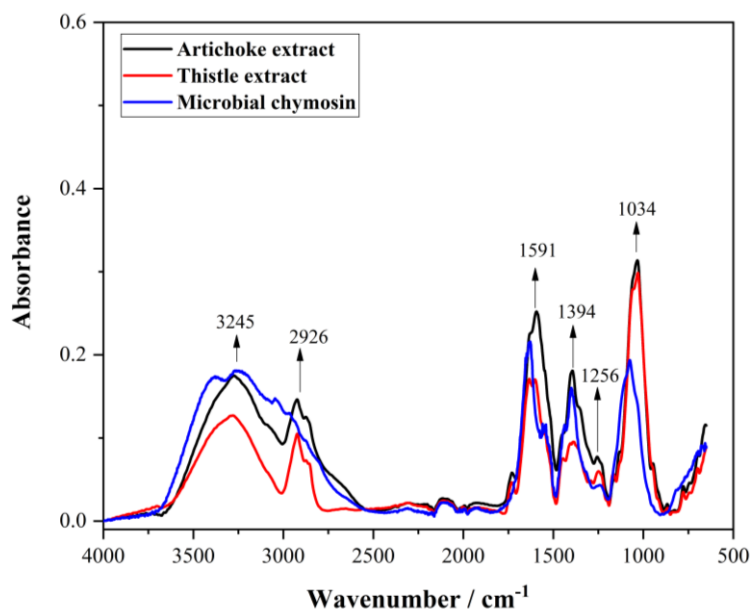


Figure 4. Characterization of the crude artichoke flower extract, thistle flower extract and microbial chymosin by MIR.

The MIR spectra reflect the interaction of electromagnetic radiation with the enzymes present in the plant extracts and microbial chymosin, generating unique vibrational movements resulting from the absorption of energy from the bonds of their functional groups that correspond to a "fingerprint" capable of differentiating the samples analyzed.¹⁹ The studied samples showed similar spectral pattern, but in the crude artichoke extract the functional groups present in the sample absorbed more energy than the other coagulants studied, resulting in more intense peaks, especially the Amide II peak at 1591 cm⁻¹, C-H at 1394 cm⁻¹ and C-O at 1265 cm⁻¹, indicating a higher concentration of these compounds in the extract and this confirms the high concentration of proteins detected by SDS-PAGE with more intense bands.

Chromatography

The fractionation of the proteins presents in the crude extract of the artichoke flower occurred by molecular weight difference. Figure 5 shows the chromatograms of the crude extracts of artichoke flower, thistle flower and microbial chymosin.

In the chromatogram of the artichoke flower extract it was possible to detect the presence of a peak of higher intensity at the time of 10.50 min, with molecular weight of 36 kDa, and may be associated with the protease Cardosin A, responsible for the hydrolysis of casein during milk coagulation. In SDS-PAGE it was also obtained a fraction with molar mass very close to 36 kDa. When compared to the thistle flower extract, it is possible to state that this higher intensity peak

may indicate a higher amount of this enzyme in the extract of the artichoke flower. It is also possible to verify the presence of other peaks with lower molecular masses, which although they were not identified, clearly showed the presence of other proteins.

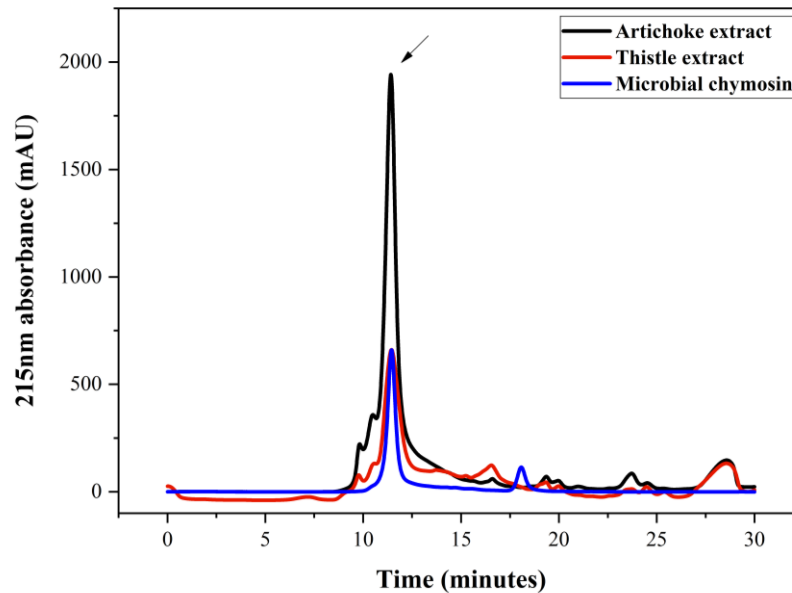


Figure 5. Chromatographic profiles obtained by molecular exclusion of the crude extracts of artichoke, thistle and microbial chymosin.

Comparing the chromatograms, the coagulants studied peaked at almost the same elution times of 10.50, 10.58 and 11.43 min for the crude extract of artichoke, thistle and microbial chymosin, respectively.

The crude plant extracts showed similarities in the chromatographic profiles and differences in peak intensities. These differences can probably be due to the discrepancy in the concentration of proteases present in the extracts, or even, by the presence of other compounds, since the extracts are not pure. From a technological point of view, the use of crude enzyme extracts in the food industry is quite advantageous, because the purification process of enzymes can involve a large number of steps and thus a significant increase in production costs.⁸ In this context, it is essential to characterize the crude plant extract and its proteases due to their potential use in food technology.

Assessment of storage stability

When considering a potential new coagulant, especially from plant sources, it is essential to evaluate its storage stability, since many plant protease sources are seasonal and not available all year round, such as artichoke flower, which is harvested between August and November.

Based on the shelf life of the commercial microbial chymosin (180 days), the crude extract

of the artichoke flower was stored under freezing for the period of (30 to 120 days) and during this period, every 30 days its proteolytic activity was evaluated.

The PA of the studied coagulants varied significantly ($p < 0.05$) during the storage time Figure 6. In the first 30 days of storage under freezing there was a loss of approximately 10% of the proteolytic activity of the crude artichoke flower extract, but after this period (30, 60 and 90 days) the proteolytic activity did not differ significantly ($p < 0.05$), with a small loss of activity, remaining practically stable until the time of 90 days of storage. This result suggests that the crude extract of the artichoke flower can be preserved under freezing for a storage period of up to 90 days, with minimal loss of activity. At 120 days there was a 32% loss of activity. The crude extract of the thistle flower showed similar behavior to the artichoke extract.

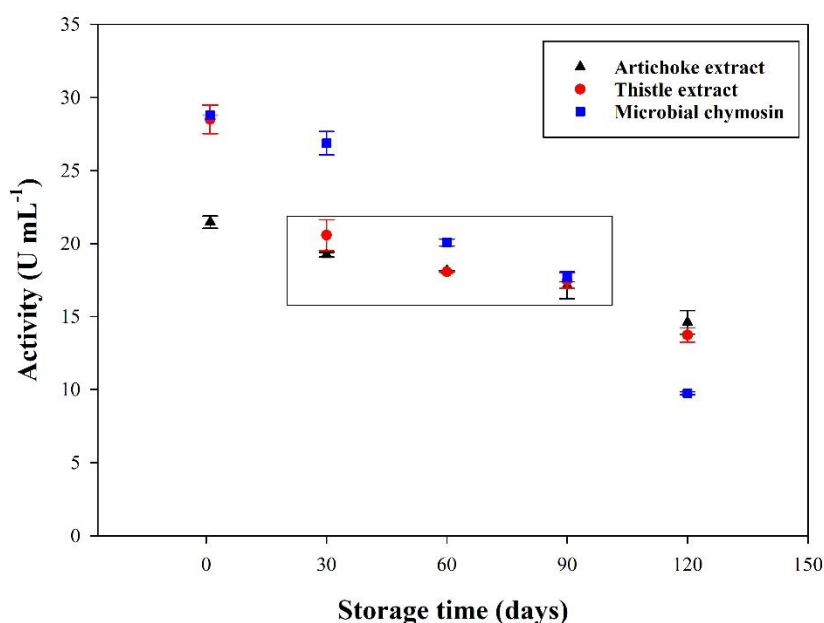


Figure 6. Evaluation of the proteolytic activity of artichoke flower crude extract, thistle flower extract and microbial chymosin during storage under freezing at 0, 30, 60, 90 and 120 days.

The microbial chymosin in 120 days of storage occurred a loss of approximately 66% of proteolytic activity. The manufacturer of the microbial chymosin indicates a shelf life of 180 days, but the results obtained indicated a reduction in PA after 120 days of storage.

The shelf life of food products is estimated statistically through models and predictive calculations, but the conditions of the food must be the same as in the model, otherwise they will not be applicable, probably some change in the conditions of commercial chymosin may have led to a change in the enzyme stability for storage. In addition, the manufacturer does not make it clear on the label that the PA of the coagulant does not remain stable throughout the storage period, which

was found in this article.

Regarding stability, one of the main obstacles to the commercialization of enzymes is the difficulty in keeping them active during long-term storage. The stability of the enzyme during long-term storage facilitates transportation and storage in sales centers. The results obtained indicate that the enzymes present in the crude extract of the artichoke flower remain active during storage under freezing for up to 90 days, suggesting that this is one of the ways to preserve the integrity of proteases for the coagulation of milk, reducing its seasonality and further reinforces that the artichoke flower extract is a viable alternative to replace microbial chymosin for cheese production.

Conclusion

The crude extract of artichoke flower showed caseinolytic and coagulation activity similar to the crude extract of thistle flower. Compared with microbial chymosin, the specificity ratio was higher, proving to be an excellent milk coagulant. From a technological point of view, obtaining crude artichoke extract is a simple and inexpensive procedure, which was used to obtain an active enzymatic preparation.

The electrophoretic profile of the artichoke flower produced in Brazil indicated the presence of only the characteristic band of cardosin A, indicating that the climate, region of flower production and other factors can influence the presence of enzymes. The chromatographic and spectroscopic profiles indicate that the crude artichoke extract has a higher concentration of milk clotting proteases.

The crude artichoke extract remained stable to storage for 90 days, presenting itself as a good milk coagulant agent in the manufacture of cheeses. The use of crude artichoke flower extract will allow the exploration of its technological potential in the production of artisanal and industrial cheeses, resulting in cheeses with unique properties and added value. We emphasize that the production of artichoke flowers has increased in Brazil, making its flowers available for the preparation of an active enzymatic extract, accessible and economically convenient, making it a viable alternative for the market.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Professor Luis Teló da Gama, University of Lisbon, Portugal, for kindly providing thistle flower pistils, the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos and Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB).

Author Contributions

Josane C. de Jesus was responsible for the formal analysis, data curation, investigation, methodology, project administration and writing original draft; Lucas C. C. Reis and Mateus P. F. Santos for the data curation and investigation; Leandro S. Santos for the conceptualization, formal analysis and supervision; Sibelli P. B. Ferrão for the conceptualization, supervision, project administration and writing review and editing.

References

1. Esposito, M.; Di Pierro, P.; Dejonghe, W.; Mariniello, L.; Porta, R.; *Food Chem.* **2016**, *204*, 115. [https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.060].
2. Bey, N.; Debbebi, H.; Abidi, F.; Marzouki, M. N.; Ben Salah, A.; *Ind Crops Prod.* **2018**, *112*, 181. [https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.050].
3. Afsharnezhad, M.; Shahangian, S. S.; Sariri, R.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *121*, 173. [https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.006].
4. Tabet, R.; Mechai, A.; Branes, Z.; Chenchouni, H.; *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2023**, *47*, 102609. [https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102609].
5. Mazorra-Manzano, M. A.; Perea-Gutiérrez, T. C.; Lugo-Sánchez, M. E.; Ramirez-Suarez, J. C.; Torres-Llanaez, M. J.; González-Córdova, A. F.; Vallejo-Cordoba, B.; *Food Chem.* **2013**, *141*, 1902. [https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.042].
6. Nogueira, L. S.; Tavares, I. M. de C.; Santana, N. B.; Ferrão, S. P. B.; Teixeira, J. M.; Costa, F. S.; Silva, T. P.; Pereira, H. J. V.; Irfan, M.; Bilal, M.; de Oliveira, J. R.; Franco, M.; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2021**, *69*, 2069. [https://doi.org/10.1002/bab.2268].
7. Khan, U. M.; Aadil, R. M.; Shabbir, M. A.; Shahid, M.; Decker, E. A.; *Food Sci. Technol.* **2023**, *43*. [https://doi.org/10.1590/fst.84922].
8. Llorente, B. E.; Obregón, W. D.; Avilés, F. X.; Caffini, N. O.; Vairo-Cavalli, S.; *Food Chem.* **2014**, *159*, 55. [https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.007].
9. El-Salam, B. A. E.-Y. A.; Ibrahim, A. E.-H. O.; El-Sayed Razek, H. A. El; *Int. J. Dairy Sci.* **2017**, *12*, 254. [https://doi.org/10.3923/ijds.2017.254.265].
10. Wang, X.; Shi, Y.; He, R.; Li, B.; Huang, A.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *144*, 325. [https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.070].
11. Soares, E. F.; da Silva, A. C.; Queiroz, A. E. S. de F.; Gomes, J. E. G.; Herculano, P. N.; Moreira, K. A.; *Cienc. Rural* **2014**, *45*, 149. [https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140310].
12. de Farias, V. A.; da Rocha, A. D. L.; Santos, A. C.; de Freitas, C. D. T.; da Silva, I. M. A.; dos Santos, D. G.; de Figueiredo, E. A. T.; de Oliveira, H. D.; *Food Res. Int.* **2020**, *127*, 108689. [https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108689].

13. Tito, F. R.; Pepe, A.; Tonon, C. V.; Daleo, G. R.; Guevara, M. G.; *Int. Dairy J.* **2020**, *104*, 104645. [<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104645>].
14. Gomes, S.; Belo, A. T.; Alvarenga, N.; Dias, J.; Lage, P.; Pinheiro, C.; Pinto, C. C.; Brás, T.; Duarte, M. F.; Martins, A. P. L.; *Int. Dairy J.* **2019**, *91*, 178. [<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.09.010>].
15. Feijoo-Siota, L.; Rama, J. L. R.; Sánchez-Pérez, A.; Villa, T. G.; *J. Biotechnol.* **2018**, *268*, 28. [<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.006>].
16. Ghribi, A. M.; Gafsi, I. M.; Blecker, C.; Attia, H.; Bouaziz, M. A.; Besbes, S.; *Food Sci. Nutr.* **2022**, *1*. [<https://doi.org/10.1002/fsn3.2981>].
17. Tengilimoglu-Metin, M. M.; Kizil, M.; *Meat Sci.* **2017**, *134*, 68. [<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.07.018>].
18. Gostin, A. I.; Waisundara, V. Y.; *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *86*, 381. [<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.015>].
19. Silva, G. M. de S.; da Costa, J. S.; Freire, J. O.; Santos, L. S.; Bonomo, R. C. F.; *Cienc. Agrotecnologia* **2021**, *45*, 1. [<https://doi.org/10.1590/1413-7054202145001721>].
20. Fernández-Salguero, J.; Sanjuán, E.; *Food Chem.* **1999**, *64*, 177. [[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00149-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00149-6)].
21. Bradford, M. M.; *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248. [<https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>].
22. Mohanty, A. K.; Mukhopadhyay, U. K.; Kaushik, J. K.; Grover, S.; Batish, V. K.; *J. Dairy Res.* **2003**, *70*, 37. [<https://doi.org/10.1017/S0022029902005927>].
23. Luo, J.; Xiao, C.; Zhang, H.; Ren, F.; Lei, X.; Yang, Z.; Yu, Z.; *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 2842. [<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13888>].
24. Anusha, R.; Singh, M. K.; Bindhu, O. S.; *Eur. Food Res. Technol.* **2014**, *238*, 997. [<https://doi.org/10.1007/s00217-014-2177-0>].
25. Laemmli, U. K.; *Nature* **1970**, *228*, 726.
26. Iizuka, T.; Faust, R. M.; *J. Res. Fac. Agric. Hokkaido Univ.* **1982**, *60*, 263.
27. *Statistical Analysis System (SAS)®, Student version*; SAS Institute Inc., USA, 2018.
28. Liu, X.; Wu, Y.; Guan, R.; Jia, G.; Ma, Y. C.; Zhang, Y.; *Food Res. Int.* **2021**, *149*, 110704. [<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110704>].
29. Silva, B. L.; Geraldés, F. M.; Murari, C. S.; Gomes, E.; da Silva, R.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *172*, 1999. [<https://doi.org/10.1007/s12010-013-0655-7>].
30. Brutti, C. B.; Pardo, M. F.; Caffini, N. O.; Natalucci, C. L.; *LWT-Food Sci. Technol.* **2012**, *45*, 172. [<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.001>].
31. Amira, B. A.; Makhoul, I.; Petrut, R. F.; Francis, F.; Bauens, J.; Attia, H.; Blecker, C.; Besbes, S.; *Food Chem.* **2017**, *225*, 258. [<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.040>].

32. Cruz, A. G.; Zacarchenco, P. B.; Oliveira, C. A. F.; Corassim, C. H.; *Processamento de Produtos Lacteos- Queijos, Leites Fermentados, Bebidas Lácteas, Sorvete, Manteiga, Creme de Leite, Doce de Leite, Soro em Pó e Lácteos Funcionais*, 1st ed; Elsevier Ltd.: Rio de Janeiro, 2017.
33. Guevara, M. G.; Daleo, G. R.; *Biotechnological applications of plant proteolytic enzymes*, 1st ed; Springer International Publishing: Mar del Plata, Argentina, 2018.
34. Chazarra, S.; Sidrach, L.; López-Molina, D.; Rodríguez-López, J. N.; *Int. Dairy J.* **2007**, *17*, 1393. [<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.04.010>].
35. Huppertz, T.; Fox, P. F.; *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 1142. [<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.011>].
36. Llorente, B. E.; Brutti, C. B.; Caffini, N. O.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 8182. [<https://doi.org/10.1021/jf049006o>].
37. Alavi, F.; Momen, S.; *Int. Dairy J.* **2020**, *107*, 104709. [<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104709>].
38. Veríssimo, P.; Faro, C.; Moir, A. J. G.; Lin, Y.; Tang, J.; Pires, E.; *Eur. J. Biochem.* **1996**, *235*, 762. [<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.00762.x>].
39. Zikiou, A.; Zidoune, M. N.; *Int. J. Dairy Technol.* **2019**, *72*, 89. [<https://doi.org/10.1111/1471-0307.12563>].
40. Sidrach, L.; García-Cánova, F. C.; Tudela, J.; Rodríguez-López, J. N.; *Phytochemistry* **2005**, *66*, 41. [<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.10.005>].

CAPÍTULO IV: Artigo II - Efeito do coagulante da flor da alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*) nas propriedades analíticas, sensoriais e bioativas em queijo maturado.

Efeito do coagulante da flor da alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*) nas propriedades analíticas, sensoriais e bioativas em queijo maturado

Josane Cardim de Jesus, Isabel Cristina de Santana Alves, Lucas Caiafa Cardoso Reis, Daniele Gomes Conceição, Rebeca Rodrigueis Vieira Onelli, Leandro Soares Santos, Sibelli Passini
Barbosa Ferrão

Resumo

Objetivou-se estudar o efeito do coagulante da flor da alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) nas propriedades analíticas, sensoriais e bioativas em queijo maturado. Queijos foram produzidos com leite bovino e com extrato das flores da alcachofra (T_A) e foram analisados com 1 dia de fabricação e com 10, 20 e 30 dias de maturação para a composição química e físico-química, perfil de textura, índices de extensão e profundidade, SDS-PAGE e caracterização sensorial por meio do Perfil Descritivo Otimizado (PDO). Análises dos peptídeos solúveis em água foram realizadas por RP-HPLC, atividade antioxidante (DPPH, β-caroteno e FRAP) e atividade antibacteriana. T_A não influenciou estatisticamente na composição química, físico-química e perfil de textura quando comparado com os demais coagulantes. Por ACP os queijos foram separados de acordo com o tempo de maturação. SDS-PAGE e RP-HPLC mostraram que durante a maturação as reações que ocorreram em T_A geraram peptídeos de diferentes pesos moleculares com atividade antioxidante e antibacteriana. No PDO o queijo T_A foi caracterizado com gosto amargo e sabor de folhas. Os queijos produzidos com T_A apresentaram características analíticas similares aos queijos produzidos com coagulantes da flor do cardo e quimosina microbiana, indicando que o extrato da alcachofra pode ser utilizado como uma fonte de coagulante alternativa à quimosina microbiana na produção de queijos.

Palavras-chaves: análise sensorial, extrato vegetal, RP-HPLC, SDS-PAGE.

1. Introdução

A coagulação do leite é a etapa mais importante na fabricação do queijo. A quimosina (EC 3.4.23.4) é a principal protease de coagulação do leite devido à sua especificidade em hidrolisar a ligação Met₁₀₅-Phe₁₀₆ da κ-caseína presente na superfície das micelas de caseína (GARCÍA et al.,

2016; GOMES et al., 2019). Cerca de 80% da produção mundial de queijo utiliza a quimosina proveniente de fontes recombinantes ou de origem microbiana (AHMED et al., 2016; MAZORRA-MANZANO et al., 2013).

A mudança de hábitos dos consumidores e de dieta têm motivado o estudo por outras fontes de enzimas para a coagulação do leite (AHMED et al., 2016). Alguns estudos já foram realizados descrevendo o uso de extratos vegetais para a produção de queijos, como o queijo Mozzarella (extrato de kiwi) (PUGLISI; PETRONE; LO PIERO, 2014), queijo tipo Cheddar (extrato da *Silybum marianum*) (COLOMBO et al., 2018) e queijo tipo Camembert (extrato da *Cynara cardunculus*) (ZIKIOU et al., 2020).

Os extratos vegetais são caracterizados pelo seu poder proteolítico que confere características específicas aos queijos produzidos (AIDER, 2021). A utilização de extratos vegetais para produção de queijo maturado pode acelerar a maturação e, conseqüentemente, a redução dos custos. As proteases presentes nas plantas pertencentes às espécies *Cynara* são um exemplo de fonte vegetal que pode ser utilizada para essa finalidade, pois possuem proteases ativas e eficazes na coagulação do leite, além disso, possuem ação proteolítica que eventualmente leva à extensa quebra das caseínas, produzindo queijos caracterizados por uma textura macia amanteigada e sabor característico de queijo maturado (ESPOSITO et al., 2016).

A alcachofra (*Cynara cardunculus* L. *scolymus*) é uma planta da espécie *Cynara* e tradicionalmente é cultivada em países da bacia do Mediterrâneo, onde as condições de verão seco e quente são ideais para o seu crescimento e reprodução (GOSTIN; WAISUNDARA, 2019). O seu cultivo foi iniciado pelos árabes como produto medicinal e alimentar, se difundindo entre os países da Europa e posteriormente para a América Latina em países como o Brasil (REOLON-COSTA; GRANDO; CRAVERO, 2017).

As flores imaturas são consumidas como vegetais ou em preparações culinárias, enquanto as flores maduras podem ser usadas como coagulantes de leite na fabricação de queijos (ESPOSITO et al., 2016). De acordo com Gostin e Waisundara (2019), a alcachofra é considerada uma mercadoria valiosa, especialmente porque os pistilos da flor seca podem ser usados como coagulante vegetal.

A origem da protease usada para coagular o leite pode influenciar nas características físicas e químicas dos queijos. Compreender as transformações que ocorrem nos queijos produzidos a partir de extratos vegetais pode fornecer informações úteis para selecionar o tempo ideal de maturação dos queijos para serem comercializados com suas características sensoriais e bioativas desenvolvidas (EL-SALAM; IBRAHIM; EL-SAYED RAZEK, 2017; GOSTIN; WAISUNDARA, 2019). Assim, objetivou-se avaliar o efeito do coagulante da flor da alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*) nas propriedades analíticas, sensoriais e bioativas em queijo maturado.

2. Material e Métodos

2.1 Obtenção dos coagulantes do leite

As flores maduras de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*), variedade roxa, foram adquiridas na região de São Roque (São Roque, São Paulo, Brasil) à latitude 23° 31' 45" Sul e longitude 47° 08' 07" Oeste. Como referência foram utilizadas flores maduras do cardo (*Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris*) obtidas de plantas cultivadas na região do Alto do Alentejo (Campo Maior, Portugal) à latitude 39° 0' 36" Norte e longitude 7° 4' 5" Oeste. O coagulante microbiano (*Aspergillus niger* var. *Awamori*) (HÁ-LA®, Brasil –Chr Hansen–força 1:3000).

2.2. Obtenção dos extratos vegetais

Para produção dos extratos vegetais foram utilizados 7g de pistilos (flor da alcachofra e flor do cardo) secos a 25°C ± 1°C, e macerados posteriormente em almofariz e adicionados em 100mL de água destilada. Essa mistura permaneceu em repouso por 24h em temperatura ambiente (25°C ±1°C) ao abrigo da luz. Os extratos homogeneizados foram filtrados em papel filtro quantitativo (Unifil, C40, 18,5cm) e utilizados para coagulação do leite (FERNÁNDEZ-SALGUERO; SANJUÁN, 1999).

2.3. Processamento dos queijos

Foram produzidos queijos com extrato das flores da alcachofra (T_A), extrato das flores do cardo (T_C) e com quimosina microbiana (T_Q). 8L de leite bovino foram utilizados para cada produção. Após filtração e pasteurização a 64°C±1°C/30 minutos, o leite foi resfriado a 32°C±1°C, adicionada 1% da cultura liofilizada mesofílica (R-704, *Lactococcus lactis* ssp *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*, Chr Hansen, Valinhos, Brasil) e após 20 minutos foi adicionado 1,3% g/L de cloreto de sódio (NaCl) e 0,4mL/L de solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) (40%) (Coalhopar, Coalhos Bio Paraná LTDA, Alto Piquiri, PR, Brasil).

Foram adicionados 8mL/L de coagulantes para T_A e T_C (Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999) e 0,4mL/L para T_Q. Após a coagulação (50 min), a coalhada foi cortada em cubos de 2cm², permanecendo em repouso para dessoragem parcial por 20min. Então foi realizado aquecimento da massa 36°C±1°C, sob agitação contínua por 20min. Após este período o soro foi drenado, realizada prensagem e enformagem em formas de 10cm de diâmetro. Os queijos foram desenformados e seguiram para a etapa de secagem por 5 dias e após esse período foram embalados a vácuo (BS 320, R. Baião, Vila Casal, Ubá, MG, Brasil) para maturação a 13°C±1°C em incubadora refrigeradora BOD (700.120, Thoth Equipamentos, Piracicaba, Brasil) com umidade relativa de 58% por até 30 dias. Em cada tempo de análise (1, 10, 20 e 30 dias) os queijos eram retirados da incubadora e posteriormente analisados.

2.4 Efeito do coagulante durante a maturação do queijo

2.4.1 Medidas analíticas

As determinações analíticas foram realizadas em triplicata nas três repetições de acordo com metodologias descritas AOAC (2016) no primeiro dia de fabricação e com 10, 20 e 30 dias de maturação para T_A, T_C e T_Q. Para a composição química dos queijos foram determinados os teores de umidade (AOAC 926.08), cinzas (AOAC 935.42), cloretos (AOAC 983.14), gordura no extrato seco (GES) (AOAC 920.125) e nitrogênio total (NT) pelo método de Kjeldahl (AOAC 2001.14). Para a caracterização físico-química foram realizadas análises de pH usando o medidor de pH digital (Modelo Hanna, São Paulo, Brasil) e acidez titulável (AOAC 920.124).

Para a avaliação da proteólise foi determinada a porcentagem de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH_{4,6}) e nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético 12% (TCA, Sigma-Aldrich St. Louis, MO) (NS TCA), determinadas pelo método de Kjeldahl. O índice de extensão da proteólise (IEP) foi obtido pela relação entre os teores de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio total (NT) ($IEP = NS\ pH_{4,6}(\%)/NT$), e o índice de profundidade de proteólise (IPP) foi obtido pela razão entre TCA 12% nitrogênio solúvel e teores de nitrogênio total ($IPP = NS\ TCA_{12\%}(\%)/NT$), segundo (WOLFSCHOON-POMBO; DE LIMA, 1989).

Os ensaios de Análise do Perfil de Textura (TPA) foram realizados em sextuplicata utilizando um Analisador de Textura TA.HD plus (Stable Micro Systems, Reino Unido). Durante os testes, amostras de 25 × 20mm (altura × diâmetro) foram comprimidas por uma placa de compressão paralela de aço inoxidável (100mm), com compressão dupla. A taxa de deformação foi programada para 1.0mm/s e 35% de compressão máxima (EL-SALAM et al., 2019). A programação do experimento e a coleta de dados foram realizadas por meio do programa computacional Texture Expert for Windows 1.20 (Stable Micro Systems, UK). Os parâmetros avaliados foram dureza, coesividade, elasticidade, mastigabilidade e adesividade, utilizando o software Brookfield Texture Pro CT V1.4.

2.5 Extração dos peptídeos solúveis em água (PSA)

Os PSA foram extraídos dos queijos (T_A, T_C e T_Q com 1 dia de produção e com 10, 20 e 30 dias de maturação) e preparados de acordo com Gonçalves et al. (2017) com modificações. 10g de queijo foram homogeneizadas com 50mL de água Milli-Q (Merck-Millipore, Bedford, MA), em um homogeneizador (Quimis, Diadema, SP, Brasil) a 200 rpm, por 1h. Os extratos dos queijos foram centrifugados três vezes a 4000g e 4°C (Sorvall, Newtown, CT, EUA), e filtrados em papel Whatman nº 41. As amostras foram liofilizadas por 48h em um liofilizador (Alpha 1-2 LDplus, Martin Christ, Berlim, Alemanha). Após liofilizadas foram mantidas a -20°C até as análises.

2.5.2 Eletroforese

Eletroforese em SDS-PAGE foi realizada em gel de separação de poli(acrilamida) 12% e de empilhamento 4% de acordo com Gonçalves et al. (2016). A eletroforese foi realizada nas amostras de queijos, que foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 na concentração de 2mg.mL⁻¹ com a adição de 0,1% (p/v) de SDS e β-mercaptoetanol a 5% (v/v). Alíquotas de 10μL foram transferidas para os géis, e as corridas realizadas a 4°C por 150min a 250V, 30mA e 15W (Apelex PS 304 Minipac II, França). Foram usados como padrões de peso molecular: miosina (200,0kDa), β-galactosidase (116,2kDa), fosforilase b (97,4kDa), albumina de soro bovino (66,2kDa), ovalbumina (45,0kDa), anidrase carbônica (31,0kDa), inibidor de tripsina (21,5kDa), lisozima (14,5kDa, mas com peso molecular aparente de 15,5kDa) e aprotinina (6,5kDa) (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Após a corrida, as proteínas foram coradas usando 0,1% (p/v) de Coomassie Blue G-250 (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) e descorado com solução de 30% (v/v) de etanol (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) e ácido acético a 7,5% (v/v) (Sigma-Aldrich St. Louis, MO).

2.5.3 Perfil Cromatográfico

O perfil cromatográfico foi obtido para os PSA por cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC) de acordo com a metodologia descrita por Ong et al. (2007) com modificações. Uma coluna C18 (250x4,6mm de diâmetro interno, 5 mm de tamanho de partícula; ZORBAX Eclipse Plus C18), acoplada a uma pré-coluna (ZORBAX SB-C 18, 4,6mm ID x 12,5mm, 5 μm), conectada ao sistema HP Agilent 1260 Infinity II foi utilizada. O método consistiu em duas fases, a primeira fase (A) composta de uma solução de acetonitrila (5%, V/V) (Sigma-Aldrich St. Louis, MO), e ácido trifluoroacético (TFA) (0,1%, V/V) (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) e a segunda (B) formada por acetonitrila (50%, V/V) e TFA (0,1%, V/V). 100mg dos PSA liofilizados foram dissolvidos em 1mL da solução de acetonitrila (5%, V/V) e ácido trifluoroacético (TFA). Uma alíquota de 20μL da amostra foi injetada automaticamente na coluna a um fluxo de 1mL.min⁻¹ na forma de gradiente das fases A e B durante 70 min. A detecção das proteases foi realizada a 215nm em um detector UV-Vis.

2.6 Atividade antioxidante dos PSA

2.6.1 Atividade de eliminação *in vitro* do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

A capacidade antioxidante *in vitro* dos PSA foi avaliada utilizando o método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) (TIMÓN et al., 2019). Uma alíquota de 500μl (2, 3, 4, 5 e 6 mg.mL⁻¹ de PSA) foi adicionada à 500μl da solução etanólica (etanol - álcool absoluto 99,8%) do radical DPPH. Após 30min de incubação ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, a redução do radical livre DPPH foi lida a 515nm de absorbância em um

espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800, Duisburg, Germany). A capacidade de eliminar o radical DPPH foi expressa pelo valor de CE_{50} que é a concentração necessária $mg.mL^{-1}$ de PSA para sequestrar 50% do radical DPPH.

2.6.2 Atividade antioxidante sistema β -caroteno-ácido linoleico

A análise antioxidante pelo método de co-oxidação do sistema β -caroteno-ácido linoleico foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Miller (1971). Foram utilizados os PSA obtidos dos tratamentos (T_A , T_C e T_Q no 1 dia de produção e com 10, 20 e 30 dias de maturação) na concentração de $5mg.mL^{-1}$. $500\mu L$ dos PSA diluídos foram transferidos para tubos e adicionou-se alíquotas de $5mL$ da emulsão contendo o sistema β -caroteno-ácido linoleico. Os tubos foram homogeneizados e as absorbâncias foram lidas imediatamente a $470nm$ em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800, Duisburg, Germany). Após a primeira leitura, os tubos foram incubados em banho-maria a $50^\circ C$ (Tecnal, model Te-184). Em intervalos de $30min$, a leitura foi repetida por até $120min$ de reação. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da oxidação. A redução da absorbância do sistema sem amostra foi considerada como 100% da oxidação.

2.6.3 Atividade antioxidante redutor férrico (FRAP)

O ensaio FRAP foi conduzido de acordo com Liu et al. (2019), com modificações. A solução de FRAP foi preparada contendo tampão de acetato, $FeCl_3$ e uma solução de TPTZ a uma razão de 10:1:1 (V/V/V), respectivamente. $50\mu L$ das amostras foram misturadas com $150\mu L$ de água destilada e $1,5mL$ da solução de FRAP e posteriormente homogeneizadas em agitador de tubos e mantidas em banho-maria (Tecnal, model Te-184) a $37^\circ C$ por $30min$ na ausência de luz. Após este tempo foi realizada a leitura a $595nm$ em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800, Duisburg, Germany). Uma curva padrão de Sulfato ferroso heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) em concentrações variáveis na faixa de $50-2000\mu M$ foi preparada. Os valores de FRAP para as amostras de PSA foram determinados usando a curva padrão e expressos como equivalente em μM de Fe (II) por μL de amostra.

2.7 Atividade antibacteriana dos PSA

A determinação da atividade antibacteriana foi realizada pela técnica da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de acordo com Dias et al. (2019). As soluções de peptídeos foram testadas frente às bactérias Gram-positivas *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 e as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 25922. Foram utilizadas microplacas esterilizadas de poliestireno com 96 poços. No teste foi utilizado um *pool* dos PSA dos queijos (T_A , T_C e T_Q , com 1 dia de produção e com 10, 20 e 30 dias de maturação) nas concentrações de 250, 125, 62,5, 31,35, 15,62,

7,81, 3,90 e 1,95 mg.mL⁻¹, em triplicata para cada tratamento. Poços contendo apenas uma fração de peptídeos e meio de cultura (controle negativo) e poços contendo apenas inóculos e meio de cultura (controle positivo) também foram preparados. A CIM foi detectável visualmente pela ausência de turvação do meio. Os valores de CIM (µg.mL⁻¹) dos PSA foram medidos como a concentração mínima na qual não ocorreu crescimento. Para avaliar a atividade bactericida dos PSA com atividade inibitória, as amostras que não apresentaram turvação do meio foram inoculadas em placas contendo ágar nutriente e incubadas a 37°C por 24h e o não crescimento do micro-organismo indicou a ação bactericida dos peptídeos solúveis.

2.8 Perfil Sensorial dos queijos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), BA, Brasil, sob o número de parecer: 3.932.331.

O Perfil Descritivo Otimizado (PDO), proposto por Silva et al. (2012), foi realizado nos tratamentos T_A, T_C e T_Q com 10, 20 e 30 dias de maturação e dividido em 6 etapas: pré-seleção dos julgadores, levantamento dos atributos, definição dos materiais de referência, sessão de familiarização dos termos descritivos, avaliação final das amostras e análise dos resultados.

A pré-seleção dos julgadores foi realizada por meio do teste da diferença triangular, em quatro sessões para verificar a habilidade dos avaliadores em discriminar as amostras. Os avaliadores que acertaram 75% dos testes foram pré-selecionados (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2007). A etapa de levantamento dos atributos foi realizada utilizando o método Rede, com apresentação de uma lista prévia. Os julgadores receberam as amostras de queijos aos pares, listando suas similaridades/dissimilaridades percebidas com relação à aparência, aroma, sabor e textura.

Após as avaliações, os atributos foram listados e levados à discussão com todos os julgadores para o levantamento dos atributos, definição e conceito dos termos descritivos e padronização dos materiais de referência (“ausente, fraco ou forte”). Com o objetivo de padronizar a forma de avaliação das amostras e expor a qual estímulo sensorial se referia cada termo, também foi realizada uma sessão para familiarização dos termos descritores e seus respectivos materiais de referência com a equipe de 16 julgadores (Tabela 1).

Tabela 1 - Termos descritores, definições e referências.

Atributos	Definição	Referências
-----------	-----------	-------------

Esfarelenta	Aparência quebradiça	Fraco: Queijo muçarela light Forte: Formulação T _C com 20 dias de maturação
Aroma amanteigado	Aroma característico de manteiga	Fraco: Manteiga Forte: Queijo Minas Padrão
Gosto ácido	Sensação ou sabor básico percebido, geralmente na lateral da língua ou excesso de salivação	Fraco: Queijo muçarela light Forte: Queijo de massa prensada
Gosto amargo	Gosto amargo que permanece na boca por algum tempo após a ingestão	Ausente: Queijo muçarela light Forte: Extrato da flor da alcachofra
Sabor amanteigado	Sabor que lembra ao da manteiga	Ausente: Queijo muçarela light Forte: Queijo Minas Padrão
Sabor de folhas secas	Gosto que remete folhas secas	Ausente: Queijo muçarela light Forte: Extrato da flor da alcachofra
Macio	Propriedade que oferece baixa resistência à mastigação	Fraco: Queijo muçarela light Forte: Formulação T _A com 20 dias de maturação
Esfarelento	Sensação de arenosidade na boca	Ausente: Queijo processado UHT Forte: Formulação T _Q com 30 dias de maturação
Pastoso	Propriedade de se desfazer quando comprimida no céu da boca	Ausente: Queijo muçarela light Forte: Formulação T _A com 30 dias de maturação

A avaliação final dos queijos foi realizada em cabines individuais, sob luz branca e temperatura controlada ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), por meio do protocolo atributo por atributo sendo avaliado apenas um atributo por sessão. Em cada sessão de avaliação o julgador recebeu as nove formulações de queijos maturados (T_A - 10, 20 e 30 dias; T_C - 10, 20 e 30 dias e T_Q - 10, 20 e 30 dias) aleatorizadas e codificadas. Os materiais de referência (“ausente, fraco ou forte”) dos atributos sensoriais avaliados também foram apresentados aos julgadores juntamente com as formulações. O julgador foi orientado a comparar as amostras de queijos com as referências antes de indicar a intensidade do estímulo sensorial na escala de avaliação.

A ficha de avaliação foi organizada por atributos, utilizando uma escala não estruturada de 9 cm com os extremos (“ausente, fraco ou “forte”). As avaliações foram conduzidas segundo o Delineamento em Blocos Casualizados (DBC), de forma que todos os julgadores avaliaram todas as formulações sendo realizadas três repetições da avaliação por julgador, totalizando 27 sessões para a avaliação de todos os atributos.

2.8.1 Análises microbiológicas

Os queijos produzidos foram analisados para presença de *coliformes* a 45°C/g, *estafilococos coagulase positiva*/g, *salmonella* sp/25g, *listeria monocytogenes*/25g em triplicata usando diluições decimais em água peptonada, cumprindo exigências de Brasil (2001).

2.9 Planejamento Experimental

O experimento foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com três repetições. Foi realizada uma regressão fatorial 3x4, 3 coagulantes (T_A , T_C e T_Q) e 4 tempo de maturação (1, 10, 20 e 30 dias), para avaliar o efeito dos coagulantes na composição dos queijos durante o tempo de maturação. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para avaliar os efeitos independentes do coagulante e tempo de maturação, e a interação entre esses fatores. A Análise de Componentes Principais (ACP) foi aplicada para visualizar similaridades e diferenças entre os queijos durante o tempo e maturação.

Os resultados do PDO foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) com duas fontes de variação. No caso de interação significativa (formulação*juiz), o teste F para a amostra foi calculado a partir do $QM_{INTERACTION}$, conforme recomendação por Stone & Sidel (2004). Esse teste foi realizado em um delineamento em Bloco Inteiramente Casualizado, no qual a análise de regressão foi aplicada às variáveis de resposta nos tratamentos ao nível de significância de 5%. A ACP foi utilizada para mapeamento sensorial das formulações. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAS (Statistical Analysis System), versão Studio 9.0.

3. Resultados Discussão

3.1 Medidas analíticas

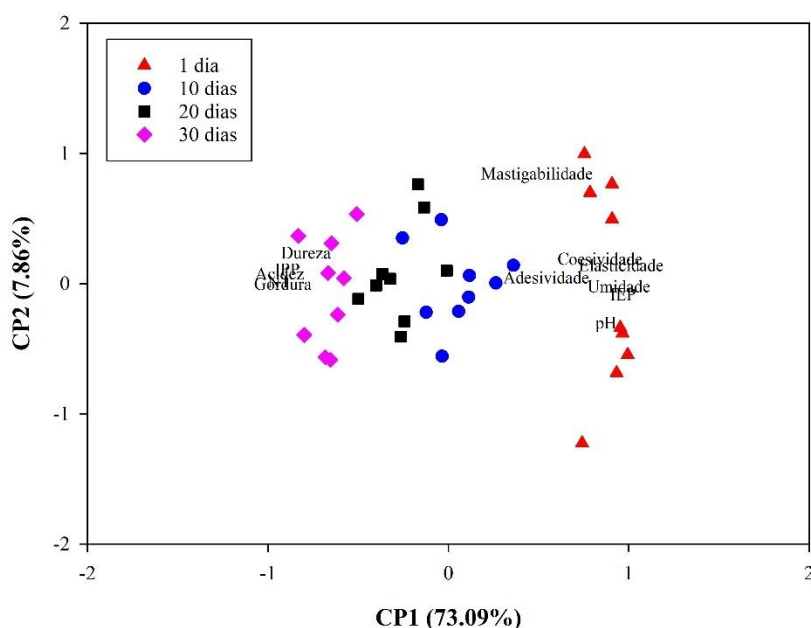
Não houve interação entre os tipos de coagulantes e os tempos de maturação ($p \geq 0,05$) para os parâmetros analisados. As mudanças na composição química dos queijos ocasionadas pelos tipos de coagulantes não foram significativas ($p \geq 0,05$) para todos os parâmetros analisados, ou seja, o uso do coagulante da flor da alcachofra na produção de queijo resultou na modificação e formação de compostos similares aos formados pelos coagulantes convencionas.

Esse resultado está de acordo com o encontrado por Llorente et al. (2014), que utilizaram extratos aquosos da flor da alcachofra como substituto do coalho na fabricação de queijo tipo Gouda, e concluíram que o tipo de coagulante não teve efeito significativo nos parâmetros químicos dos queijos. A partir desses resultados é possível afirmar que o extrato da flor da alcachofra pode ser considerado uma alternativa à quimosina microbiana na produção de queijo.

Estatisticamente o efeito do tempo de maturação foi significativo ($p \leq 0,05$), indicando

alteração dos parâmetros analisados com o tempo. Essas alterações já eram esperadas, pois durante a maturação do queijo ocorrem um conjunto de reações químicas, bioquímicas e microbiológicas, alterando sua composição química e características físico-químicas, e para melhor visualização do efeito do tempo de maturação foi realizada análise de componentes principais (Figura 1).

Figura 1 - Dispersão das amostras de queijo produzidos com extrato da flor da alcachofra (T_A), extrato da flor do cardo (T_C) e quimosina microbiana (T_Q) com 1 dia de produzido e com 10, 20, e 30 dias de maturação. IEP- índice de extensão da proteólise; IPP- índice de profundidade da proteólise.



De acordo com o gráfico de dispersão dos dados, as amostras foram agrupadas em relação ao tempo de maturação, sendo observado a formação de 4 grupos distintos. Os dois primeiros componentes CP's explicaram 80,95% da variância total dos dados.

O CP1 apresentou 73,09% para explicação das variáveis, sendo o principal responsável pela distinção das amostras de acordo com o tempo de maturação e correlacionou-se significativamente ($p \leq 0,05$) de maneira negativa com os parâmetros de acidez, gordura, NT, IPP e dureza, e de maneira positiva com pH, umidade, IEP, adesividade, elasticidade e coesividade. Já o CP2 apresentou 7,86% da explicação das variáveis se correlacionando de maneira significativa ($p \leq 0,05$) e positiva com a variável mastigabilidade.

Essas observações sugerem que o PC1 descreveu principalmente as reações da proteólise ao longo do tempo de maturação, influenciado principalmente pelo conteúdo de NT e mudanças na textura do queijo. Durante os primeiros dias após a fabricação, o coagulante residual associado à alta umidade do queijo, hidrolisa a α - e β -caseínas levando a formação de peptídeos de alto peso

molecular, resultando em elevados valores do IEP, ocasionando o enfraquecimento da rede proteica e alterando a textura (KHATTAB et al., 2019). Essas reações foram observadas na escala positiva do gráfico no CP1, indicando que as amostras presentes nessa região (queijos com 1 dia de produzido e com 10 dias de maturação) apresentaram elevados valores de pH, umidade, IEP, maior adesividade, elasticidade, adesividade e coesividade.

O aumento do tempo de maturação resultou no aumento da acidez e diminuição do pH, devido à conversão da lactose em ácido lático pela ação das bactérias lácticas e pela degradação proteica, levando à formação de grupos iônicos, provocando a diminuição do pH. Hill & Kethireddipalli (2012) ressaltam que a diminuição do pH em queijos maturados torna a matriz de caseína menos solúvel, ocasionando a liberação da água e conseqüentemente a redução da umidade no queijo.

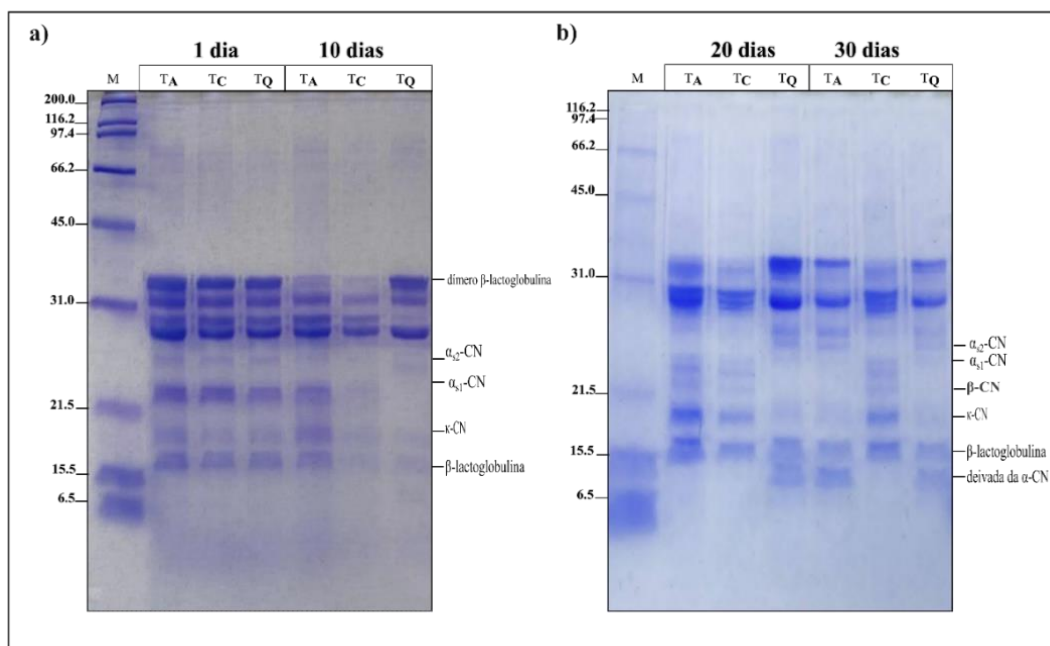
Os queijos com 20 e 30 de maturação dispersos na escala negativa do gráfico apresentaram altos valores de NT, gordura, IPP e dureza. Com o aumento do tempo de maturação peptídeos de alto peso molecular continuam a ser degradados, causando o aumento dos valores de NT e conseqüentemente aumento do IPP, liberando os compostos responsáveis pelo sabor e aroma de queijos maturados, reduzindo a dureza (Figura 1).

3.2 Eletroforese

O uso de técnicas eletroforéticas para avaliar os padrões de degradação das caseínas durante a maturação torna-se importante devido aos seus efeitos nas propriedades texturais e sensoriais do queijo. Esta análise indicou que diferentes padrões puderam ser observados, onde a presença de cada banda refletiu o perfil de proteína ou peptídeos presentes nos queijos.

A análise dos efeitos proteolíticos do T_A com 1 dia de fabricação sobre a caseína total revelou bandas primárias bem definidas (Figura 2a), correspondendo às frações da caseína α_{s1} , α_{s2} , β e κ , além da proteína do soro β -lactoglobulina, ressaltando que esse perfil de hidrólise foi semelhante para T_C e T_Q. Li et al. (2018) encontraram resultados similares ao avaliarem a ação do extrato vegetal do Tamarillo (*Solanum betaceum*) no leite, observando frações proteicas associadas a α , β e κ -caseína e proteína do soro β -lactoglobulina, indicando a ampla atividade hidrolítica do extrato vegetal sob a caseína.

Figura 2 - Gel de SDS-PAGE representativo dos queijos produzidos com diferentes coagulantes: a) com 1 dia de produção e 10 dias de maturação; b) 20 e 30 dias de maturação. M- Marcador de peso molecular; T_A - queijo produzido com extrato da alcachofra; T_C – queijo produzido com extrato do cardo e T_Q – queijo produzido com quimosina microbiana.



No 10º dia de maturação, para todos os tratamentos, a redução da intensidade de algumas bandas foi perceptível (Figura 2a). Essa redução sugere a degradação das proteínas, o que pode levar às mudanças no conteúdo de NT, aumento IEP e alteração da textura do queijo. A banda referente às α -caseínas mostrou uma diminuição progressiva na intensidade com o tempo (Figura 2b).

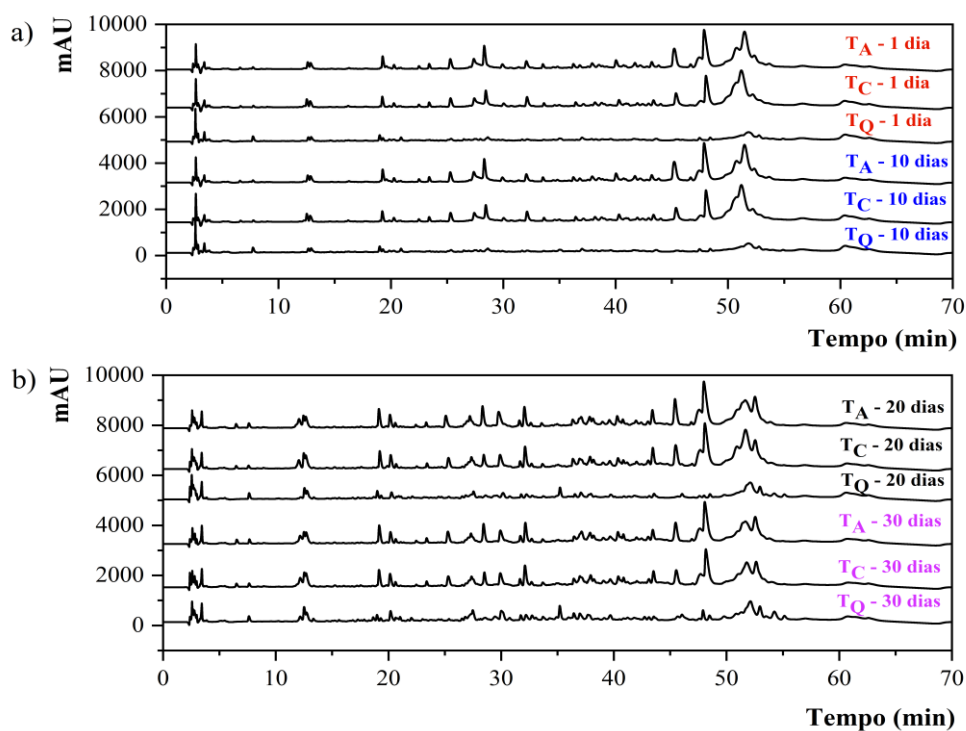
Com 20 dias de maturação T_Q apresentou comportamento diferente de T_A e T_C com o surgimento de peptídeo derivado da α -caseína. Com 30 dias foi possível visualizar semelhanças na distribuição do peso molecular das bandas obtidas nos tratamentos T_A e T_Q, principalmente do peptídeo derivado da α -caseína (Figura 2b). De acordo com Álvarez Ramos et al. (2022), os peptídeos derivados da hidrólise das α -caseína durante a maturação podem apresentar diversas atividades biológicas, com atividades antioxidante e antimicrobiana.

3.3 Peptídeos bioativos

3.3.1 Perfil cromatográfico dos PSA

Para confirmar a hidrólise das proteínas do queijo, o perfil dos PSA foi obtido por RP-HPLC (Figuras 3a e 3b).

Figura 3 – Cromatogramas dos PSA dos queijos produzidos com extrato da flor da alcachofra - T_A, extrato da flor do cardo -T_C e quimosina microbiana -T_Q. a) com 1 dia de produção e 10 dias de maturação; (b) 20 e 30 dias de maturação.



Os cromatogramas dos PSA de T_A e T_C apresentaram-se semelhantes entre si e diferentes de T_Q , no número de picos para os tempos analisados, provavelmente como consequência do processo de hidrólise da caseína durante a maturação. A maioria dos peptídeos eluíram entre 1 e 65min de retenção em todos os tratamentos (Figuras 3a e 3b).

Durante os estágios iniciais de maturação (dia 1 e 10 dias de maturação) a proteólise deve-se principalmente à ação do coagulante residual na coalhada do queijo. As caseínas são hidrolisadas em peptídeos de alto a médio peso molecular. Isso explica por que entre 35 e 55min de eluição percebe-se a presença efetiva desses peptídeos, que correspondem à peptídeos hidrofóbicos derivados principalmente da degradação de α - e β -caseínas (BORAN; SULEJMANI; HAYALOGLU, 2023).

Esse fato ocorreu principalmente em T_A e T_C , que são queijos produzidos com coagulantes vegetais e caracterizados por sua forte ação proteolítica residual sob a caseína nos primeiros estágios da maturação (Figura 3a). De acordo com Kocak et al. (2020) os picos eluídos em 20-50 min de tempo de retenção podem estar associados com a atividade antioxidante dos queijos.

Com o aumento do tempo de maturação (20 e 30 dias) todos os tratamentos apresentaram picos mais perceptíveis nos tempos de eluição entre 10 e 25min (Figura 3b). Essa região é caracterizada por peptídeos hidrofílicos de baixo peso molecular (ALBENZIO et al., 2013). Os PSA extraídos dos queijos produzidos com coagulantes vegetais apresentaram um número maior de picos e em maior intensidade, o que mostra que esses queijos podem apresentar características biológicas como atividade antioxidante mais elevada devido a presença maior dos PSA, além da mudança de

textura e sabores diferenciados ocasionados pelos mesmos, que ao serem formados promovem alterações na estrutura da massa dos queijos.

Provavelmente a presença desses peptídeos ocorreu devido à proteólise secundária ocasionada pelas proteinases iniciadoras, o que é consistente com os resultados obtidos na análise da profundidade da proteólise nos queijos, que apresentou valores elevados com o tempo de maturação.

Os peptídeos gerados com o tempo de maturação podem ser provenientes da degradação da α , β e κ -caseína, que de acordo com Khattab et al. (2019) são peptídeos potenciais captadores de radicais livres. Portanto, os peptídeos liberados durante a maturação detectados por RP-PPLC podem apresentar diversas atividades biológicas, que podem ser avaliadas por meio de ensaios *in vitro*.

3.3.2 Atividade antioxidante

Os resultados indicaram que não houve efeito para o tipo de coagulante ($p \geq 0,05$), e nenhuma interação entre o tipo de coagulante e o tempo de maturação ($p \geq 0,05$), apenas o efeito do tempo de maturação foi significativo ($p \leq 0,05$). Os resultados das análises antioxidantes dos PSA extraídos dos queijos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividade antioxidante dos PSA (média \pm desvio padrão) dos queijos produzidos com extrato da flor da alcachofra- T_A, extrato da flor do cardo-T_C e quimosina microbiana-T_Q com 1 dia de fabricação e com 10, 20 e 30 dias de maturação.

Queijo	Tempo dias	Atividade antioxidante		
		DPPH mg.mL ⁻¹	FRAP μ M. μ L ⁻¹	β -caroteno%
T _A	1	3,77 \pm 0,28	0	95,65 \pm 2,17
	10	4,88 \pm 0,38	0	56,04 \pm 0,39
	20	4,73 \pm 0,31	183,61 \pm 7,89	38,26 \pm 1,05
	30	5,35 \pm 0,43	235,83 \pm 5,35	11,78 \pm 0,59
T _C	1	4,56 \pm 0,19	0	89,12 \pm 1,51
	10	5,10 \pm 0,18	0	53,76 \pm 1,62
	20	5,23 \pm 0,16	175,27 \pm 4,58	35,34 \pm 0,34
	30	5,61 \pm 0,18	223,05 \pm 12,50	7,51 \pm 0,29
T _Q	1	4,96 \pm 0,47	0	92,61 \pm 5,59
	10	4,89 \pm 0,69	0	41,57 \pm 0,44
	20	5,37 \pm 0,21	175,27 \pm 1,27	30,85 \pm 1,23
	30	5,46 \pm 0,39	218,61 \pm 6,02	6,27 \pm 0,34

*DPPH:2,2-difenil-1-picrilhidrazil; FRAP: Poder redutor férrico.

Na atividade de eliminação do radical DPPH, os valores de EC₅₀ dos PSA aumentaram durante a maturação do queijo, indicando ação antioxidante dos peptídeos gerados pela proteólise primária. Esses resultados estão consistentes com os achados de Ramos et al. (2022), que durante a maturação do queijo Gouda observaram ação antioxidante dos peptídeos formados na proteólise primária.

O potencial antioxidante redutor férrico (FRAP) está diretamente correlacionado com a hidrólise dos peptídeos no queijo, o que irá determinar a capacidade das amostras em doar elétrons e podem reduzir os intermediários oxidados da peroxidação lipídica, para que possam atuar como antioxidantes secundários (LIU et al., 2019).

Os peptídeos extraídos dos queijos com 1 e 10 de maturação não apresentaram potencial antioxidante FRAP, indicando que essa ação antioxidante foi provavelmente ocasionada pela presença de peptídeos menores provenientes da proteólise secundária nos queijos com 20 e 30 dias maturação, independente do tipo de coagulante utilizado. Desta forma, quanto mais maturado é o queijo, maior será o potencial redutor férrico.

A ação antioxidante secundária determinada pelo método sistema β-caroteno/ácido linoleico diminuiu com o aumento do tempo de maturação (Tabela 2). As amostras de PSA dos queijos, inibiram satisfatoriamente o efeito das condições favoráveis à oxidação que foram inseridas durante a análise. Provavelmente, essa ação protetora ocorreu devido à presença de peptídeos de alto peso molecular provenientes da ação proteolítica dos coagulantes utilizados.

3.3.3 Atividade antibacteriana

Os PSA dos queijos mostraram atividade de inibição dos micro-organismos *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 na concentração de 250 e 125mg.mL⁻¹ em todos os tempos de maturação para T_A, T_C e T_Q, e para *Escherichia coli* TACC 25922 com 20 e 30 dias de maturação para os três tratamentos analisados. Esses resultados sugerem que em tempos maiores de maturação (20 e 30 dias) os peptídeos liberados pela ação de enzimas durante a proteólise apresentam características bioativas com capacidade de inibição das bactérias.

Esses resultados são compatíveis com Fialho et al. (2018) que avaliaram a atividade antibacteriana dos PSA obtidos do queijo Minas artesanal da Canastra, apresentando ação inibitória contra *Escherichia coli*. Além disso, os estudos do perfil dos peptídeos bioativos obtidos de queijos coalho com potencial antibacteriano realizados por Dias et al. (2019) indicou ação antibacteriana capaz de inibir o crescimento de *Enterococcus faecalis*.

A atividade antibacteriana presente nos PSA dos queijos é um indicador importante que pode atuar na proteção da flora do queijo, agindo na inibição de patógenos como *Enterococcus faecalis* principalmente nos períodos iniciais de maturação dos queijos (1 e 10 dias),

3.4 Caracterização sensorial

Para verificar o efeito dos diferentes coagulantes e tempos de maturação nos atributos sensoriais dos queijos, modelos de regressão foram obtidos (Tabela 3).

Tabela 3 - Modelagem estatística do efeito do coagulante e d tempo de maturação sobre os atributos sensoriais dos queijos produzidos com extrato da flor da alcachofra- T_A, extrato da flor do cardo-T_C e quimosina microbiana-T_Q.

Atributos	T _A		T _C		T _Q	
	Equação	R ²	Equação	R ²	Equação	R ²
Aroma amanteigado	$\hat{Y}=0,21x-0,47$	0,72	$\hat{Y}= 0,21x+0,57$	0,89	$\hat{Y}= 0,23x-1,04$	0,85
Superfície esfarelenta	$\hat{Y}=\bar{Y}=1,80$	**	$\hat{Y}=\bar{Y}=1,78$	**	$\hat{Y}=\bar{Y}=1,77$	**
Gosto ácido	$\hat{Y}= 0,25x-0,88$	0,87	$\hat{Y}= 0,22x+0,20$	0,78	$\hat{Y}= 0,20x+0,69$	0,79
Gosto amargo	$\hat{Y}= 0,33x-3,04$	0,93	$\hat{Y}=0,32x-2,43$	0,88	$\hat{Y}=0,13x-0,86$	0,27
Sabor amanteigado	$\hat{Y}= 0,29x-1,89$	0,79	$\hat{Y}= 0,13x-0,98$	0,31	$\hat{Y}=\bar{Y}=1,74$	**
Sabor de folhas	$\hat{Y}= 0,32x-2,59$	0,95	$\hat{Y}= 0,32x-2,61$	0,95	$\hat{Y}=\bar{Y}=0,09$	**
Textura esfarelenta	$\hat{Y}=\bar{Y}=1,38$	**	$\hat{Y}=\bar{Y}=1,78$	**	$\hat{Y}=0,17x+0,272$	0,64
Textura macia	$\hat{Y}=\bar{Y}=8,12$	**	$\hat{Y}=\bar{Y}=8,54$	**	$\hat{Y}=\bar{Y}=8,11$	**
Textura pastosa	$\hat{Y}=0,20x+2,75$	0,70	$\hat{Y}=0,22x+2,44$	0,74	$\hat{Y}=0,16x+2,29$	0,82

O atributo aroma amanteigado para os tratamentos estudados apresentou ajuste de modelo linear crescente ($p \leq 0,05$), indicando que durante a maturação foram gerados compostos que conferem esse atributo ao queijo, percebido pelo painel treinado. A superfície esfarelenta não apresentou ajuste de modelo ($p \geq 0,05$) para todos os tratamentos estudados (Tabela 3).

Para os gostos (ácido e amargo) e os sabores (amanteigado e folhas), os julgadores perceberam que durante a maturação ocorreu o aumento da percepção desses atributos. Esse resultado é compatível com o observado para medidas analíticas, onde os parâmetros de acidez e proteólise secundária aumentaram com tempo, indicando que com o aumento do tempo de maturação os compostos menores como peptídeos e resíduos de aminoácidos livres são formados na matriz do queijo, o que pode levar à alteração do sabor.

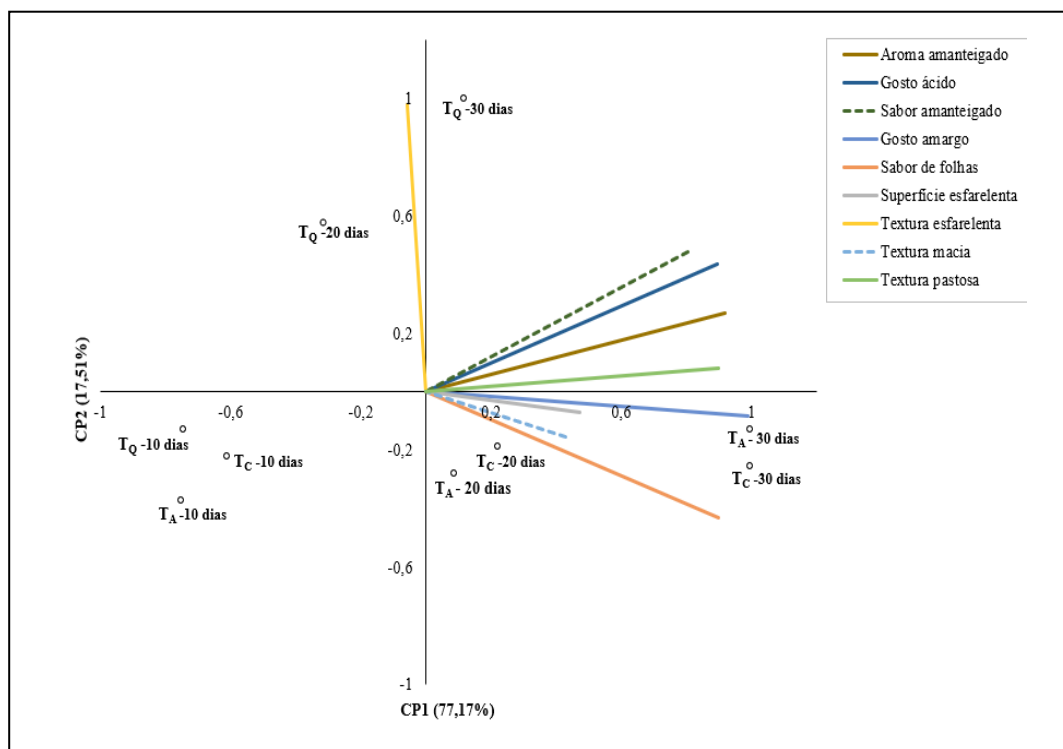
A presença dos peptídeos hidrofóbicos, verificada na RP-HPLC dos PSA, pode ter contribuído para a percepção dos painelistas do gosto amargo nos queijos produzidos com extratos vegetais, uma vez que os peptídeos responsáveis pelo gosto amargo são caracterizados por serem hidrofóbicos. De acordo com Barracosa et al. (2021), os queijos produzidos com extrato do cardo

são caracterizados pela presença de gosto residual amargo e essa característica não impede que o queijo seja apreciado pelos consumidores.

Para o atributo textura esfarelenta, os julgadores não perceberam diferença em relação ao tempo de maturação nos queijos T_A e T_C, e para a textura macia não foi ajustado um modelo significativo (Tabela 3). Os julgadores perceberam que a textura pastosa para o T_A variou com o tempo, apresentando um efeito linear crescente ($p \leq 0,05$). Esse resultado é compatível com as análises de textura instrumental, para o parâmetro de elasticidade, que está relacionado com a velocidade com que o material deformado volta à condição inicial após a compressão do mesmo, que durante o tempo de maturação apresentou um efeito crescente, resultado semelhante para T_C e T_Q.

A ACP foi realizada para verificar a correlação entre os tratamentos e os atributos sensoriais (Figura 4). No mapa descritivo obtido pela caracterização sensorial dos queijos foram extraídos dois componentes principais (CPs) que descreveram 94,32% da variância dos dados. A representação gráfica do perfil sensorial dos queijos permite a visualização direta da informação global de uma maneira eficiente e fácil de detectar a similaridade entre os tratamentos durante a maturação.

Figura 4 - Mapa sensorial descritivo obtido por Análise de Componentes Principais dos queijos produzidos com extrato da flor da alcachofra - T_A, extrato da flor do cardo - T_C e quimosina microbiana - T_Q, com 10, 20 e 30 dias de maturação.



Na separação dos queijos observou-se a formação de quatro grupos: o primeiro composto

pelos tratamentos T_A, T_C e T_Q com 10 dias de maturação, o segundo T_A e T_C com 20 dias de maturação, o terceiro T_A e T_C com 30 dias de maturação e o quarto grupo foi composto pelo T_Q com 20 e 30 dias de maturação. Os atributos aroma amanteigado, gosto ácido, sabor amanteigado, sabor de folhas, gosto amargo, superfície esfarelenta, textura macia e textura pastosa se correlacionaram positivamente de maneira significativa ($p \leq 0,05$) com o CP1 (77,17%). Com o CP2 (17,15%) apenas o atributo de textura esfarelenta se correlacionou positivamente ($p \leq 0,05$).

Os queijos T_A, T_C e T_Q maturados por 10 dias apresentaram características similares. Com 20 dias maturação T_A, T_C foram caracterizados com sabor folhas, superfície esfarelenta e textura macia. Com 30 dias de maturação o T_A e T_C caracterizaram-se com gosto amargo, sabor de folhar, textura pastosa, aroma amanteigado e gosto ácido. Resultado semelhante foi encontrado por Llorente et al. (2014) quando um painel sensorial treinado caracterizou o queijo Gouda produzido com extrato da alcachofra e detectou um sabor amargo nos queijos no final da maturação com 44 dias. T_Q com 20 e 30 dias de maturação foi caracterizado pelos painelistas com textura esfarelenta.

4. Conclusão

Os queijos produzidos com os diferentes coagulantes apresentaram propriedades químicas e caracterização físico-química semelhantes, indicando que o extrato da flor da alcachofra pode ser um coagulante alternativo à quimosina microbiana.

O estudo permitiu obter informações sobre as mudanças durante o período de maturação, independente do tipo de coagulante, e essas mudanças confirmaram que a maturação é uma etapa importante levando as transformações nas medidas analíticas, textura e sabor, além da formação de compostos com atividades biológicas. É importante compreender as transformações que ocorrem nos queijos produzidos com extrato da flor da alcachofra para se obter informações úteis, que podem ser usadas em estudos futuros na seleção do tempo ideal de maturação dos queijos para serem comercializados com suas características sensoriais e bioativas desenvolvidas.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (nº 140204/2020-2). Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao professor Luis Teló da Gama, Universidade de Lisboa-Portugal, pelo gentil fornecimento de pistilos de flores de cardo, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Alimentos e Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB).

5. Referências

AHMED, S. A. et al. Novel milk-clotting enzyme from *Bacillus stearothermophilus* as a coagulant in UF-white soft cheese. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 241–249, 2016.

AIDER, M. Potential applications of ficin in the production of traditional cheeses and protein hydrolysates. **JDS Communications**, v. 2, n. 5, p. 233–237, 2021.

ALAVI, F.; MOMEN, S. Aspartic proteases from thistle flowers: Traditional coagulants used in the modern cheese industry. **International Dairy Journal**, v. 107, p. 104709, 2020.

ALBENZIO, M. et al. Composition and sensory profiling of probiotic Scamorza ewe milk cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 2792–2800, 2013.

ÁLVAREZ RAMOS, L. et al. Antioxidant and antihypertensive activity of Gouda cheese at different stages of ripening. **Food Chemistry: X**, v. 14, n. July 2021, 2022.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists**. In W. Horowitz (Ed.), **Official methods of analysis of AOAC International**. 20th ed. ed. Rockville, USA: [s.n.].

BARRACOSA, P. et al. Biochemical diversity of cardoon flowers (*Cynara cardunculus* L.): Predicting PDO Mediterranean cheese textures. **Food Bioscience**, v. 39, n. March 2020, 2021.

BORAN, O. S.; SULEJMANI, E.; HAYALOGLU, A. A. Acceleration of proteolysis, flavour development and enhanced bioactivity in a model cheese using Kuflu cheese slurry: An optimisation study. **Food Chemistry**, p. 135495, 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 12 (2001) Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF. **Diário Oficial da União**, v. 2001, p. 5, 2001.

COLOMBO, M. L. et al. Miniature cheeses made with blends of chymosin and a vegetable rennet from flowers of *Silybum marianum*: Enzymatic characterization of the flower-coagulant peptidase. **Food Chemistry**, v. 266, p. 223–231, 2018.

DIAS, G. M. P. et al. Perfil dos peptídeos bioativos obtidos de queijos de coalho com potencial antimicrobiano. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 24, n. 1, p. 1–7, 2019.

EL-SALAM, B. A. E.-Y. A.; IBRAHIM, A. E.-H. O.; EL-SAYED RAZEK, H. A. EL. Purification and characterization of milk clotting enzyme from artichoke (*Cynara cardunculus* L.) flowers as coagulant on white soft cheese. **International Journal of Dairy Science**, v. 12, n. 4, p. 254–265, 2017.

ESPOSITO, M. et al. Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease. **Food Chemistry**, v. 204, p. 115–121, 2016.

FERNÁNDEZ-SALGUERO, J.; SANJUÁN, E. Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes' milk cheese. **Food Chemistry**, v. 64, n. 2, p. 177–183, 1999.

FIALHO, T. L. et al. Extraction and identification of antimicrobial peptides from the Canastra

- artisanal minas cheese. **Food Research International**, v. 107, p. 406–413, 2018.
- FURTADO, M. M. **Queijos Semiduros**. 1. ed. São Paulo - Brasil: Setembro Editora, 2019.
- GARCÍA, V. et al. Physicochemical, microbiological, textural and sensory changes during the ripening of pasteurised goat milk cheese made with plant coagulant (*Cynara scolymus*). **International Journal of Dairy Technology**, v. 69, n. 1, p. 96–102, 2016.
- GOMES, S. et al. Characterization of *Cynara cardunculus L.* flower from Alentejo as a coagulant agent for cheesemaking. **International Dairy Journal**, v. 91, p. 178–184, 2019.
- GONÇALVES, B. H. R. F. et al. Evaluation of the peptide profile with a view to authenticating buffalo mozzarella cheese. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 7, p. 1586–1593, 2016.
- GONÇALVES, B. H. R. F. et al. Buffalo mozzarella chemical composition and authenticity assessment by electrophoretic profiling. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 1841–1851, 2017.
- GOSTIN, A. I.; WAISUNDARA, V. Y. Edible flowers as functional food: A review on artichoke (*Cynara cardunculus L.*). **Trends in Food Science and Technology**, v. 86, p. 381–391, 2019.
- HILL, A. R.; KETHIREDDIPALLI, P. **Dairy Products: Cheese and Yogurt**. Third Edit ed. [s.l.] Elsevier, 2012.
- KHATTAB, A. R. et al. Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. **Trends in Food Science and Technology**, v. 88, n. January, p. 343–360, 2019.
- KOCAK, A. et al. Role of using adjunct cultures in release of bioactive peptides in white-brined goat-milk cheese. **Lwt**, v. 123, n. January, p. 109127, 2020.
- LI, Z. et al. Rheological and structural properties of coagulated milks reconstituted in D2O: Comparison between rennet and a tamarillo enzyme (tamarillin). **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 170–178, 2018.
- LIU, D. et al. Antioxidant activity of peptides in postmortem aged duck meat as affected by cooking and in vitro digestion. **International Journal of Food Properties**, v. 22, n. 1, p. 727–736, 2019.
- LLORENTE, B. E. et al. Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases. **Food Chemistry**, v. 159, p. 55–63, 2014.
- MAZORRA-MANZANO, M. A. et al. Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1902–1907, 2013.
- MEILGAARD, M. C.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 4th. ed. Boca Raton: [s.n.].
- MILLER, H. . SHORT COMMUNICATIONS A Simplified Method for the Evaluation of

Antioxidants. **Short Communications**, n. 3831, p. 3831, 1971.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. **Lait**, v. 87, n. 2, p. 149–165, 2007.

PUGLISI, I.; PETRONE, G.; LO PIERO, A. R. A kiwi juice aqueous solution as coagulant of bovine milk and its potential in Mozzarella cheese manufacture. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 1, p. 67–72, 2014.

REOLON-COSTA, A.; GRANDO, M. F.; CRAVERO, V. P. Alcachofra (*Cynara Cardunculus* [var. *Scolymus* (l) Fiori]): alimento funcional e fonte de compostos promotores da saúde. **Revista Fitos**, v. 10, n. 4, p. 526–538, 2017.

SILVA, R. C. S. N. et al. Optimized Descriptive Profile: A rapid methodology for sensory description. **Food Quality and Preference**, v. 24, n. 1, p. 190–200, 2012.

STONE, H.; SIDEL, J. **Sensory Evaluation Practices**. 3rd. ed. New York: [s.n.].

TIMÓN, M. L. et al. Antioxidant peptides (<3 kDa) identified on hard cow milk cheese with rennet from different origin. **Food Research International**, v. 120, p. 643–649, 2019.

WOLFSCHOON-POMBO, A.; DE LIMA, A. Extensão e profundidade de proteólise em queijo Minas Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios de Cândido Tostes**, v. 44, n. 261, 1989.

ZIKIOU, A. et al. Algerian cardoon flowers express a large spectrum of coagulant enzymes with potential applications in cheesemaking. **International Dairy Journal**, v. 105, p. 1–8, 2020.