



PPGECAL
ENGENHARIA E
CIÊNCIA DE ALIMENTOS



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
RECREDENCIADA PELO DECRETO ESTADUAL Nº 16.825, DE 04.07.2016
Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos

ARTHUR POMPILIO DA CAPELA

**INVESTIGAÇÃO DO PERFIL ENZIMÁTICO E TECNOLÓGICO DO EXTRATO
DE ALCACHOFRA (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) PARA COAGULAÇÃO DO
LEITE DE DIFERENTES ESPÉCIES**

ITAPETINGA – BAHIA

2026

ARTHUR POMPILO DA CAPELA

**INVESTIGAÇÃO DO PERFIL ENZIMÁTICO E TECNOLÓGICO DO EXTRATO
DE ALCACHOFRA (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) PARA COAGULAÇÃO DO
LEITE DE DIFERENTES ESPÉCIES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia e Ciência de Alimentos
(PPGECAL) da Universidade Estadual do
Sudoeste da Bahia (UESB) como requisito para a
obtenção do Título de Doutor.

Área de Concentração: Ciências de Alimentos

Orientadora: Prof.^a DSc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão

Co-orientadores: Prof. DSc. Leandro Soares Santos

Prof.^a DSc. Cristina Maria dos Santos Conceição

ITAPETINGA – BAHIA

2026

637.3
C241i

Capela, Arthur Pompilio da.

Investigação do perfil enzimático e tecnológico do extrato de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *Scolymus*) para coagulação do leite de diferentes espécies. / Arthur Pompilio da Capela. – Itapetinga-BA: UESB, 2026.
106f.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (PPGECAL) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) como requisito para a obtenção do Título de Doutor. Área de Concentração: Ciências 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. Cristina Maria dos Santos Conceição.

1. Leite - Coagulantes vegetais. 2. Leite – Extrato de alcachofra – Coagulante alternativo. 3. Queijo – Produção – Maturação – Flor de alcachofra. 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. Conceição, Cristina Maria dos Santos. V. Título.

CDD (21): 637.3

Catálogo na Fonte:

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

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Alcachofra – Flor – Coagulante vegetal

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “INVESTIGAÇÃO DO PERFIL ENZIMÁTICO E TECNOLÓGICO DO EXTRATO DE ALCACHOFA (*Cynara cardunculus* L. Scolymus) PARA COAGULAÇÃO DO LEITE DE DIFERENTES ESPÉCIES.”

Autor (a): ARTHUR POMPÍLIO DA CAPELA

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

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

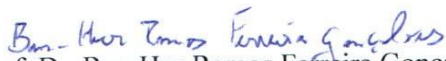
Prof.^a Dr.^a Cristina Maria dos Santos Conceição

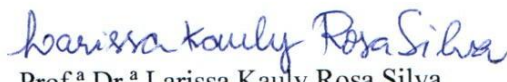
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **DOUTOR EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

Documento assinado digitalmente
 **JOSANE CARDIM DE JESUS**
Data: 13/04/2026 15:02:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Josane Cardim de Jesus
(UFLA)


Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo
(UESB)


Prof. Dr. Ben-Hur Ramos Ferreira Gonçalves
(UFSB)


Prof.^a Dr.^a Larissa Kaully Rosa Silva
(UFOB)


Prof.^a Dr.^a Sibelli Passini Barbosa Ferrão
Orientadora – UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 26 de fevereiro de 2026.

Dedico este trabalho a todos os estudantes de doutorado que
travam, em silêncio, batalhas contra o cansaço, a solidão e a autocrítica.
Que vocês encontrem paz ao saber que não estão sozinhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, pela oportunidade de realização do doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, pela concessão da bolsa de estudos.

A vida é feita de encontros e alguns têm o poder de nos transformar por inteiro. Este trabalho, mais do que um requisito acadêmico, é uma tradução das batalhas, das entregas e das pessoas que caminharam ao meu lado.

Aos meus pais Sueli e Antônio, pilares do meu mundo, vocês me ensinaram a transformar dúvida em força e medo em impulso. Obrigado por cada renúncia, por cada palavra de incentivo e, sobretudo, por acreditarem em mim até quando eu mesmo hesitei. Foi por meio do amor de vocês e da confiança constante que aprendi que os sonhos se constroem passo a passo, no tempo certo e com os valores certos. Este diploma é, antes de tudo, de vocês!

À minha orientadora, Professora Sibelli, deixo uma reverência que é também afeto. Obrigado pela generosidade incansável, pela escuta atenta e pela exigência que nunca foi obstáculo, mas impulso. Suas palavras firmes, delicadeza e sensibilidade raras foram fundamentais não apenas para a construção deste trabalho, mas para o meu crescimento pessoal e profissional. A senhora foi, sem dúvida, uma das melhores partes desse percurso. Foi um privilégio caminhar ao seu lado!

À minha avó Alzira, raiz do que sou, abrigo silencioso que nunca deixou de me sustentar. Mesmo de longe, é presença que me firma, que me orienta, que me ensina, com gestos e amor, a ser inteiro.

Ao amor da minha vida, Guilherme, meu parceiro em tudo. Você viveu todo esse percurso comigo, chorou minhas inseguranças, aplaudiu minhas vitórias e segurou minha mão quando as palavras me faltaram. Seu carinho e sua lealdade foram meu alicerce. Não sei como teria sido sem você e ainda bem que não precisei descobrir.

Às minhas irmãs Alice e Maria, que crescem todos os dias com brilho próprio. Vocês serão ainda mais do que eu sonhei para mim. Suas existências me emocionam e me fortalecem. Acreditem sempre nos seus caminhos, eles serão brilhantes!

À minha família, especialmente à tia Georgina, que silenciosamente suportou minha ausência, minhas frustrações e minha incessante preocupação com a pesquisa. Sem suas orações, amor e paciência, este trabalho não existiria.

À minha banca de defesa, pela disponibilidade, generosidade e valiosas contribuições.

À Universidade de Évora, pela oportunidade de realização do doutorado-sanduíche, à minha coorientadora, Professora Cristina, pela confiança, dedicação e por acreditar em mim e no meu potencial, e à Graça e à Margarida, pela paciência, respeito e amizade. Sou grato por todas as trocas e ensinamentos.

À Josane e Rebeca, pela parceria e amizade. Sou profundamente feliz pela oportunidade de aprender com duas mulheres cuja inteligência e integridade me inspiram. Ao lado de vocês, tudo se tornou mais leve e agradável.

A toda a equipe do Grupo de Estudos em Leite, especialmente Raphael e Sumayah, pelo convívio, apoio e bons momentos compartilhados. Sou feito também dessas presenças que se somaram à minha travessia com afeto, escuta e partilha.

A André e Sofia, pelo acolhimento e por todas as memórias que criamos juntos. Conhecê-los foi meu verdadeiro presente nessa jornada do outro lado do Atlântico.

Aos professores, colegas e amigos que encontrei ao longo da jornada, meu agradecimento mais sincero. Cada cada palavra de apoio, cada gesto silencioso de cuidado foi farol em alguma curva do caminho.

E, por fim, é preciso dizer: o que me transformou não foi apenas o início, nem tampouco a linha de chegada, mas tudo o que vivi durante o doutorado. Porque foi no meio dessa travessia que me descobri mais forte, mais inteiro, mais vivo.

*A nossa cura é, em
essência, superar
nossos medos associ-
ados à vida — me-
dos que não quere-
mos enfrentar — e
encontrar nossa
própria inspiração,
uma visão do futu-
ro, que sabemos que
estamos aqui para
ajudar a criar.*

— James Redfield

CAPELA, A. P. **Investigação do perfil enzimático e tecnológico do extrato de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) para coagulação do leite de diferentes espécies.** Itapetinga – BA: UESB, 2026, 100 p. (Tese – Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos)

RESUMO

Os coagulantes vegetais têm sido amplamente estudados quanto à sua aplicação na produção de queijos. No entanto, podem apresentar limitações em termos de eficiência e controle da proteólise, em função da variabilidade na composição do leite entre espécies e da especificidade enzimática, o que pode restringir seu desempenho tecnológico. Nesse contexto, este estudo investigou, de forma comparativa, o comportamento enzimático e tecnológico do extrato da flor de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) em leites de diferentes espécies (vaca, ovelha, cabra, búfala, égua, burra e camela), como alternativa aos coagulantes comerciais vegetais à base de cardo (*Cynara cardunculus* L.) e convencionais. A avaliação dos parâmetros de coagulação dos extratos de alcachofra e cardo, revelou desempenho dependente da espécie de leite. Os maiores valores atividade coagulante do leite (ACL) foram observados para os leites de ovelha (184–248 IMCU mL⁻¹), cabra (99–214 IMCU mL⁻¹) e búfala (88–192 IMCU mL⁻¹). A atividade proteolítica (AP) não apresentou diferenças significativas para o extrato de alcachofra, sendo maior para o extrato de cardo no leite de cabra (5,70 g NPN 100 g⁻¹ Nt). Os maiores rendimentos foram observados para o leite de ovelha (7,15–7,43 g 100 g⁻¹), independentemente do coagulante. Os leites de égua e burra não coagularam nas condições experimentais testadas, enquanto o leite de camela apresentou coagulação caracterizada por baixa firmeza do gel e elevada sinerese (> 90%). Embora os perfis espectrais não tenham evidenciado diferenças significativas entre as espécies, os perfis cromatográficos indicaram efeito do tipo de coagulante sobre a proteólise primária, com maior intensidade para o extrato da flor de cardo em leites de búfala e camela. Posteriormente foram avaliadas as interações entre a especificidade enzimática e as respostas tecnológicas dos coagulantes vegetais comerciais de cardo, extrato aquoso da flor de alcachofra e coagulantes convencionais. As diferenças nos perfis enzimáticos dos coagulantes vegetais, influenciaram os parâmetros de coagulação, refletindo-se em variações no teor de proteína, AP, ACL, na razão de especificidade (RE) e nas propriedades físicas da coalhada, como liberação de água (LA) e capacidade de retenção de água (CRA). Essas diferenças, confirmadas por espectroscopia no infravermelho médio e cromatografia por exclusão molecular, resultaram em desempenho tecnológico comparável ao coagulante microbiano. Com base nesses resultados, foram selecionados um coagulante vegetal comercial e o extrato de alcachofra para aplicação na produção de queijo a partir de leite de vaca, resultando em maior acidez titulável e umidade, menores teores de gordura e proteína, menor dureza e adesividade e menor luminosidade. Em resumo, esta tese apresentou uma visão integrada do comportamento enzimático e tecnológico do extrato da flor de alcachofra, demonstrando como a especificidade enzimática e a composição do leite influenciam os parâmetros de coagulação e o desempenho tecnológico, bem como modulam a proteólise e as características dos queijos obtidos. Os resultados indicam que os extratos de alcachofra e cardo apresentam melhor aptidão tecnológica para os leites de ovelha, cabra e búfala e que a seleção do coagulante deve, portanto, considerar a espécie de

leite e o perfil tecnológico desejado. Além disso, os queijos produzidos utilizando coagulantes vegetais de cardo e o extrato de alcachofra foram caracterizados como queijos de muito alta umidade, com textura macia e maior extensão de proteólise, associados a um perfil tecnológico compatível com queijos frescos.

Palavras-chave: coagulantes vegetais, propriedades de coagulação, aptidão tecnológica.

CAPELA, A. P. **Investigation of the enzymatic and technological profile of artichoke extract (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) for the coagulation of milk from different species.** Itapetinga – BA: UESB, 2026, 100 p. (PhD Thesis in Food Science and Engineering)

ABSTRACT

Plant-based coagulants have been extensively studied for their application in cheese production. However, they may have limitations in terms of efficiency and control of proteolysis, due to variability in milk composition across species and enzymatic specificity, which can restrict their technological performance. In this context, this study comparatively investigated the enzymatic and technological behavior of artichoke flower extract (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) in milk from different species (cow, sheep, goat, buffalo, mare, donkey, and camel), as an alternative to commercial cardoon-based (*Cynara cardunculus* L.) and conventional vegetable coagulants. The evaluation of the coagulation parameters of artichoke and cardoon extracts revealed that performance depended on the type of milk. The highest milk coagulant activity (MCA) values were observed for sheep's milk (184–248 IMCU mL⁻¹), goat's milk (99–214 IMCU mL⁻¹), and buffalo milk (88–192 IMCU mL⁻¹). Proteolytic activity (PA) did not show significant differences for the artichoke extract, being higher for the thistle extract in goat milk (5.70 g NPN 100 g⁻¹ Nt). The highest yields were observed for sheep milk (7.15–7.43 g 100 g⁻¹), regardless of the coagulant. Mare and donkey milk did not coagulate under the experimental conditions tested, while camel milk exhibited coagulation characterized by low gel firmness and high syneresis (>90%). Although the spectral profiles did not show significant differences between species, the chromatographic profiles indicated an effect of the type of coagulant on primary proteolysis, with greater intensity for the cardoon flower extract in buffalo and camel milk. Subsequently, the interactions between enzymatic specificity and the technological responses of commercial plant-based coagulants derived from cardoon, aqueous artichoke flower extract, and conventional coagulants were evaluated. Differences in the enzymatic profiles of the plant-based coagulants influenced coagulation parameters, resulting in variations in protein content, PA, MCA, the specificity ratio (SR), and the physical properties of the curd, such as water release (WR) and water-holding capacity (WHC). These differences, confirmed by mid-infrared spectroscopy and size-exclusion chromatography, resulted in technological performance comparable to that of the microbial coagulant. Based on these results, a commercial cardoon-based coagulant and artichoke extract were selected for use in cheese production from cow's milk, resulting in higher titratable acidity and moisture, lower fat and protein contents, lower hardness and adhesiveness, and lower brightness. In summary, this thesis presented an integrated view of the enzymatic and technological behavior of artichoke flower extract, demonstrating how enzymatic specificity and milk composition influence coagulation parameters and technological performance, as well as modulate proteolysis and the characteristics of the resulting cheeses. The results indicate that artichoke and cardoon extracts exhibit better technological suitability for sheep, goat, and buffalo milk, and that the selection of the coagulant should therefore consider the milk species and the desired technological profile. Furthermore, the cheeses produced using cardoon-based coagulants and artichoke extract were characterized as very high-moisture cheeses with a soft texture and greater proteolysis, associated with a technological profile compatible with fresh cheeses.

Keywords: vegetable coagulants, coagulation properties, technological aptitude.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I: Referencial Teórico

Figura 1 - Flor do cardo (<i>Cynara cardunculus</i> L.).....	30
Figura 2 - Flor da alcachofra (<i>Cynara cardunculus</i> L. var. <i>scolymus</i>).....	32
Figura 3 - Fluxograma geral para fabricação de queijo.....	34
Figura 4 - Resumo das duas etapas envolvidas na coagulação enzimática do leite.....	35
Figura 5 - Principais fatores que afetam o tempo de coagulação do leite. a: temperatura (°C); b: pH; c: concentração de Ca; d: concentração de coagulante; e: concentração de proteína (%).	35
Figura 6 - Sequência de aminoácidos da κ -caseína mostrando o sítio de clivagem da quimosina (seta para baixo).	37
Figura 7 - Sequência comparativa (alinhada) da região sensível à quimosina da κ -caseína de 7 tipos de leite. Os códigos de uma letra e os códigos de aminoácidos de três letras correspondentes são A, Ala; C, Cys; E, Glu; F, Phe; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met.....	38
Figura 8 - Esquema para determinação visual do tempo de coagulação.....	40
Figura 9 - Representação esquemática da coagulação do leite. Liberação de macropéptídeos (círculos preenchidos) e alterações na viscosidade relativa (quadrados preenchidos) durante o curso da coagulação do coalho.....	41
Figura 10 - (a) Representação dos parâmetros lactodinamográficos. TC: tempo de coagulação (min); k_{20} : tempo para firmeza de 20 mm (min); a_{30} : firmeza 30 min após a adição da enzima (mm). (b) Classificação das curvas lactodinamográficas mais comuns. A: leite ideal; B, C e D: leite abaixo do ideal; E, F e DD: leite fraco; FF: leite sem coagulação.....	43
Figura 11 - Esquema da representação gráfica tipo do Optigraph® e indicação dos parâmetros medidos pelo equipamento. R: tempo de início da coagulação (s); AR e A2R: consistência do gel para o dobro de R (V); consistência do gel para o triplo de R (V); 0K20: consistência padrão	

equivalente a 6,5 Volt (s); A₂₀ e A₄₀: intensidade do sinal óptico após 20 e 40 minutos do início do ensaio.....44

CAPÍTULO III: Propriedades de coagulação e aptidão tecnológica de leites de diferentes espécies coagulados com aquosos de flores de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) e cardo (*Cynara cardunculus* L.)

Figura 1 - Espectros obtidos por MIR dos coágulos de leite de vaca, cabra, ovelha, búfala, égua, burra e camela, obtidos na faixa de 4000–600 cm⁻¹, após coagulação com extrato de alcachofra (A), extrato de cardo (B) e quimosina recombinante (C).....70

Figura 2 - Grau de hidrólise da caseína, expresso como a fração proteica solúvel em pH 4,6 em relação à proteína total. ^{a, b, A, B} Médias seguidas pela mesma letra minúscula (tipo de leite) e pela mesma letra maiúscula (coagulante) não diferem entre si (p > 0,05).....71

Figura 3 - Perfis cromatográficos por CLAE-FR do nitrogênio solúvel em pH 4,6 dos coágulos obtidos com extrato de alcachofra (A), extrato de cardo (B) e quimosina recombinante (C).....72

CAPÍTULO IV: Caracterização funcional e tecnológica de coagulantes vegetais comerciais e do extrato da flor de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) e seus efeitos nas propriedades físico-químicas, de textura e proteômicas do queijo fresco

Figura 1 - Caracterização por espectroscopia no infravermelho médio (MIR) de: A) coagulantes vegetais líquidos comerciais (A, B, C, D, E, F, G, J, L e Z) e do extrato da flor de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*); B) coagulante microbiano (*Aspergillus niger* var. *awamori*) e coalhos animais (1–3: cordeiro, cabrito e bezerro, respectivamente).....93

Figura 2 - Perfis cromatográficos por exclusão molecular de: A) coagulantes vegetais comerciais (A, B, C, D, E, F, G, J, L e Z) e do extrato da flor de alcachofra (*Cynara cardunculus*

L. var. scolymus); B) coagulante microbiano (*Aspergillus niger var. awamori*) e coalhos animais (1–3: cordeiro, cabrito e bezerro, respectivamente).....94

Figura 3 - Espectros obtidos por espectroscopia no infravermelho de queijos produzidos com coagulante vegetal Z (CVZ), extrato da flor de alcachofra (EA) e coagulante microbiano (CM): (A) dados brutos de NIR e (B) dados brutos de MIR.....98

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: Referencial Teórico

Tabela 1 - Principais ligações peptídicas clivadas por cardosinas e quimosina nas frações caseínicas de diferentes tipos de leite.....31

Tabela 2 - Composição geral dos diferentes tipos de leite.....36

Tabela 3 - Perfis proteicos dos diferentes tipos de leite.....37

Tabela 4 - Distribuição das frações de caseína no leite bovino, bubalino, caprino, ovino, equídeo, asinino e camélídeo.....38

Tabela 5 - Características da caseína dos diferentes tipos de leite.....39

CAPÍTULO III: Propriedades de coagulação e aptidão tecnológica de leites de diferentes espécies coagulados com extratos de flores de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) e cardo (*Cynara cardunculus* L.)

Tabela 1 - Valores médios $\pm$ desvio padrão da atividade coagulante e proteolítica de extratos aquosos de alcachofra, cardo e quimosina recombinante.....64

Tabela 2 - Valores médios $\pm$ desvio padrão do rendimento potencial de fabricação de queijos e sinerese.....66

Tabela 3 - Valores médio $\pm$ desvio padrão das propriedades de coagulação de diferentes tipos de leite, usando coagulantes de alcachofra, cardo e quimosina recombinante.....68

CAPÍTULO IV: Caracterização funcional e tecnológica de coagulantes vegetais comerciais e do extrato da flor de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) e seus efeitos nas propriedades físico-químicas, de textura e proteômicas do queijo fresco

Tabela 1 - Valores médios $\pm$ desvio padrão do teor de proteína, atividade proteolítica, atividade de coagulação do leite e razão de especificidade para os coagulantes.....89

Tabela 2 - Valores médios $\pm$ desvio padrão das propriedades físicas da coalhada formada por diferentes coagulantes.....91

Tabela 3 - Valores médios $\pm$ desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos, analíticos, de textura e rendimento dos queijos produzidos com coagulante vegetal Z (CVZ), extrato da flor de alcachofra (EA) e coagulante microbiano (CM).....95

Tabela 4 - Valores médios $\pm$ desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos do soro dos queijos produzidos com coagulante vegetal Z (CVZ), extrato da flor de alcachofra (EA) e coagulante microbiano (CM).....97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

0K20 Consistência padrão equivalente a 6,5 Volt

A₂₀ Intensidade do sinal óptico aos 20 minutos

A2R Consistência do gel para o triplo de R

a₃₀ Firmeza 30 min após a adição da enzima

A₄₀ Intensidade do sinal óptico aos 40 minutos

ACL Atividade de Coagulação do Leite

AP Atividade Proteolítica

AR Consistência do gel para o dobro de R

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-EM Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas

CLAE-FR Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

CM Coagulante Microbiano

CMP Caseinomacropeptídeo

CRA Capacidade de Retenção de Água

CVZ Coagulante Vegetal Z

DOP Denominação de Origem Protegida

EA Extrato da flor de alcachofra

FDA Food and Drug Administration

G' Módulo elástico

G'' Módulo viscoso

GMP Glicomacropeptídeo

IDF Federação Internacional de Laticínios

IMCU Unidade Internacional de Coagulação do Leite

ISSO Organização Internacional para Padronização

k20 Tempo para firmeza de 20 mm

LA Liberação de Água

MIR Espectroscopia no Infravermelho Médio

NIR Espectroscopia no Infravermelho Próximo

NPN Nitrogênio Não Proteico

Nt Nitrogênio Total

QPF Quimosina Produzida por Fermentação

R Tempo de início da coagulação

RE Razão de Especificidade

SDS-PAGE Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio

TC Tempo de Coagulação

LISTA DE SÍMBOLOS

°C Grau Celsius

cm Centímetro

cm⁻¹ Número de onda

g Grama

×g Aceleração relativa da gravidade

g L⁻¹ Gramas por litro

g m⁻² Gramas por metro quadrado

g 100 g⁻¹ Gramas por 100 gramas

g 100 mL⁻¹ Gramas por 100 mililitros

g NPN 100 g⁻¹ Nt Gramas de nitrogênio não proteico por 100 gramas de nitrogênio total

h Hora

IMCU g⁻¹ Unidades Internacionais de Coagulação do Leite por grama

IMCU mL⁻¹ Unidades Internacionais de Coagulação do Leite por mililitro

L Litro

L h⁻¹ Litros por hora

L min⁻¹ Litros por minuto

m³ min⁻¹ Metros cúbicos por minuto

mAU Miliunidade de absorbância

mg mL⁻¹ Miligramas por mililitro

min Minuto

mm Milímetro

mm s⁻¹ Milímetros por segundo

mL Mililitro

mL min⁻¹ Mililitros por minuto

mL L⁻¹ Mililitros por litro

M Molaridade

nm Nanômetro

rpm Rotações por minuto

s Segundo

U mL⁻¹ unidades de atividade enzimática por mililitro

V Volt

v/v Volume por volume

m/v Massa por volume

µg mL⁻¹ Microgramas por mililitro

µmol Micromol

µm Micrômetro

η Viscosidade

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: Referencial Teórico	25
1. Introdução	26
2. Referencial Teórico	28
2.1 Agentes coagulantes na fabricação de queijos.....	28
2.2 Coagulação enzimática do leite.....	33
2.3 Composição e papel tecnológico das proteínas do leite de diferentes espécies	36
2.4 Avaliação da atividade coagulante e da cinética de formação do gel	39
2.5 Metodologias analíticas para avaliação da hidrólise da κ -caseína e perfil proteico.....	44
3. Referências	46
CAPÍTULO II: Objetivos	53
Objetivos.....	54
CAPÍTULO III: Investigação do comportamento enzimático e tecnológico durante a coagulação do leite de diferentes espécies utilizando extrato da flor de alcachofra (<i>Cynara cardunculus</i> L. var. <i>scolymus</i>) e cardo (<i>Cynara cardunculus</i> L. var. <i>sylvestris</i>)	55
Resumo.....	56
1. Introdução	57
2. Materiais e Métodos	58
2.1 Agentes coagulantes	58
2.2 Obtenção e preparo das amostras de leite	59
2.3 Caracterização dos extratos vegetais.....	59
2.3.1 Atividade de coagulação do leite.....	59
2.3.2 Atividade proteolítica	60
2.4 Rendimento potencial de fabricação de queijos e sinerese.....	60
2.5 Propriedades de coagulação do leite.....	60
2.6 Caracterização dos coágulos	61

2.6.1 Caracterização espectroscópica	61
2.6.2 Grau de hidrólise da caseína	61
2.6.3 Caracterização cromatográfica	62
2.7 Desenho experimental e análises estatísticas	62
3. Resultados e Discussão	63
3.1 Caracterização dos extratos vegetais.....	63
3.2 Rendimento potencial de fabricação de queijos e sinerese	65
3.3 Propriedades de coagulação do leite.....	67
3.4 Caracterização dos Coágulos	69
4. Conclusão.....	73
Agradecimentos.....	74
5. Referências	74
CAPÍTULO IV: Impactos tecnológicos de coagulantes vegetais comerciais e extrato da flor de alcachofra (<i>Cynara cardunculus</i> L. var. <i>scolymus</i>) no perfil físico-químico e proteômico de queijos frescos.....	79
Resumo.....	80
1. Introdução	81
2. Materiais e Métodos.....	82
2.1 Amostras	82
2.2 Caracterização dos coagulantes.....	83
2.2.1 Concentração de proteínas.....	83
2.2.2 Atividade proteolítica (AP)	83
2.2.3 Atividade de coagulação do leite (ACL).....	84
2.2.4 Determinação da razão de especificidade (RE)	84
2.2.5 Propriedades físicas da coalhada.....	84
2.2.6 Caracterização espectroscópica	85
2.2.7 Caracterização cromatográfica	85

2.3 Produção do queijo fresco	86
2.3.1 Rendimento do queijo.....	87
2.3.2 Análises do soro.....	87
2.4 Parâmetros físico-químicos e medidas analíticas dos queijos	87
2.5 Perfil espectroscópico	88
2.6 Desenho experimental.....	88
3. Resultados e Discussão	89
3.1 Caracterização dos coagulantes.....	89
3.2 Parâmetros físico-químicos, analíticos e espectroscópicos dos queijos	95
4. Conclusão.....	99
Agradecimentos.....	99
5. Referências	100
CAPÍTULO V: Conclusões Gerais.....	104
Conclusões Gerais	105

CAPÍTULO I: Referencial Teórico

1. Introdução

A produção global de queijo atingiu 22,6 milhões de toneladas em 2024, com expectativa de crescimento contínuo, impulsionado pela priorização do queijo como produto de maior valor agregado e pela forte demanda no comércio internacional (USDA, 2025). O queijo de leite bovino é responsável por aproximadamente 90% desse volume, sendo o percentual restante correspondente a queijos produzidos a partir de leites de ovinos, caprinos e bubalinos, enquanto camelos e equinos contribuem com volumes limitados (Papademas & Bintsis, 2022; IDF, 2024).

A composição do leite exerce influência direta sobre o processamento e a qualidade dos queijos. Além de diferenças no teor de proteína e gordura totais, variações são observadas nas proporções relativas das frações de caseína diferem entre espécies. Os leites de ruminantes apresentam predominância de caseínas, enquanto leites de não ruminantes, como camelídeos e equinos, caracterizam-se por maior teor relativo de proteínas do soro (Roy et al., 2020; Rocha-Mendoza & Jiménez-Flores, 2022). As diferenças composicionais condicionam a eficiência do processo de coagulação e a estrutura do gel formado, impactando a aptidão tecnológica entre espécies.

A adequação de agentes coagulantes do leite pode ser avaliada por meio de parâmetros como a atividade coagulante e a atividade proteolítica, associadas, respectivamente, à clivagem inicial da κ -caseína e à proteólise subsequente, bem como pela razão de especificidade (Luo et al., 2018; Liu et al., 2021; Onelli et al., 2025). Adicionalmente, respostas tecnológicas como a velocidade de agregação micelar e a firmeza do gel podem ser interpretadas em conjunto com a extensão e o perfil da proteólise primária, determinados por análises do grau de hidrólise da caseína e por técnicas analíticas complementares, permitindo caracterizar o comportamento da coagulação e relacioná-lo à especificidade da ação enzimática (Gomes et al., 2019; Cai et al., 2023; Kayihura, 2024; Onelli et al., 2025).

Independentemente da espécie de origem do leite ou do coagulante empregado, a clivagem enzimática ocorre pela ação de proteases específicas na ligação peptídica Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da κ -caseína, levando à desestabilização das micelas de caseína, o que induz a coagulação do leite (Fogeiro et al., 2020). Tradicionalmente, essas proteases eram extraídas do abomaso de bezerros, contudo a disponibilidade limitada, o custo e aumento do consumo de queijo, aliados restrições éticas, regulatórias e religiosas têm impulsionado a adoção de coagulantes alternativos (Moshin et al., 2024).

Entre os substitutos do coalho destacam-se os coagulantes microbianos e a quimosina produzida por fermentação. No entanto, preocupações de parte dos consumidores em relação ao uso de organismos geneticamente modificados têm limitado a aceitação desse coagulante em determinados mercados (Wang et al., 2020; Fox & Guinee, 2022). Nesse contexto, os coagulantes de origem vegetal têm ganhado destaque na pesquisa científica e despertado interesse industrial, em função de sua disponibilidade e do potencial de aplicação na produção de queijos.

Queijos elaborados com coagulantes de origem vegetal são encontrados principalmente na Península Ibérica, sendo predominantemente produzidos a partir de leite cru de ovelha e cabra, alguns dos quais possuem Denominação de Origem Protegida (DOP). Portugal, Espanha e Itália apresentam ampla diversidade de queijos produzidos com extrato de flores secas de cardo (*Cynara cardunculus* L.), incluindo Serra da Estrela, Serpa e Azeitão; *La Serena*, *Manchego* e *Torta del Casar*; e *Fiore Sardo* e *Cacio Fiore*, respectivamente.

A alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) é uma espécie cultivada com ampla distribuição geográfica, tradicionalmente destinada ao consumo alimentar (Tengilimoglu-Metin & Kizil, 2017). Em função da presença de proteases com atividade sobre a caseína do leite, sua utilização como coagulante na produção de queijos tem sido considerada uma alternativa viável, com potencial de agregação de valor ao produto final (De Jesus et al., 2024; Onelli et al., 2026). Devido a menor variabilidade em relação a populações silvestres, favorece a obtenção de extratos mais reprodutíveis, além de possibilitar o aproveitamento de inflorescências fora do padrão comercial (Colombo et al., 2020).

Embora estudos anteriores confirmem a atividade coagulante de extratos da flor de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*), a compreensão de seu desempenho tecnológico ainda é limitada, especialmente no que se refere à influência da composição do leite e à sua comparação com os coagulantes convencionalmente utilizados pela indústria. A ampliação desse conhecimento contribui para fundamentar tecnicamente sua aplicação na produção de queijos, ampliando as possibilidades de diversificação de processos e produtos no setor lácteo.

2. Referencial Teórico

2.1 Agentes coagulantes na fabricação de queijos

A etapa de coagulação é fundamental na fabricação da maioria dos queijos e é induzida, predominantemente, pela ação de proteinases. Essas enzimas catalisam a clivagem das proteínas do leite em peptídeos de menor massa molecular e podem ser derivadas de fontes animais, vegetais ou microbianas, sendo comercializadas como preparações de grau alimentício em diferentes formas físicas. Durante o processamento, a maior parte do coagulante adicionado é removida com o soro, enquanto uma fração permanece retida na coalhada, desempenhando papel relevante na proteólise inicial das caseínas e influenciando as características finais do queijo (Nuñez, 2022).

Por definição, o termo coalho refere-se exclusivamente ao extrato do abomaso de ruminantes, sendo que preparações alternativas devem ser denominadas coagulantes, conforme estabelecido pela Federação Internacional de Laticínios (IDF, 1990). O coalho é uma preparação enzimática composta predominantemente por quimosina, podendo conter também enzimas com atividades secundárias, como pepsina e lipases. Sua principal fonte é o abomaso de ruminantes jovens, como bezerros, cabritos e cordeiros (Nuñez, 2022). Tradicionalmente, o coalho de bezerro foi amplamente utilizado na fabricação da maioria das variedades de queijo, enquanto os coalhos de cordeiro e cabrito são empregados em menor escala, associados a produtos específicos (Fox & Guinee, 2022; McSweeney, 2022).

A quimosina (EC 3.4.23.4), anteriormente denominada renina, apresenta elevada afinidade pela ligação peptídica Phe₁₀₅–Met₁₀₆ da κ -caseína, exibindo a maior atividade específica de coagulação do leite entre as proteinases aspárticas. Além da quimosina, ruminantes secretam outras enzimas com atividade coagulante, como a pepsina (EC 3.4.23.1) e a gastricsina (EC 3.4.23.3). A pepsina, embora capaz de promover a coagulação do leite, apresenta elevada atividade proteolítica geral sob condições ácidas, sendo menos específica e capaz de hidrolisar diversas ligações peptídicas nas caseínas (McSweeney, 2022). Preparações comerciais de coalho apresentam, em geral, teores de quimosina variando entre 50% e 97% (Uniacke-Lowe & Fox, 2017).

A redução na disponibilidade de vitelos, associada ao aumento contínuo da produção mundial de queijos, estimado em aproximadamente 2–3% ao ano nas últimas décadas, resultou em um desequilíbrio entre a oferta e a demanda por coalho, elevando seus custos e

impulsionando a busca por substitutos tecnologicamente adequados (Fox et al., 2017; Uniacke-Lowe & Fox, 2017).

Embora diversas proteinases sejam capazes de coagular o leite, muitas apresentam atividade proteolítica excessiva em relação à atividade coagulante, o que pode resultar em hidrólise inespecífica das caseínas, perda de peptídeos para o soro, redução do rendimento e defeitos sensoriais, como alterações de sabor e textura (Fox & Guinee, 2022). Em condições típicas de fabricação, o coagulante ideal deve hidrolisar preferencialmente a região C-terminal da κ -caseína, apresentar baixa afinidade por outras frações caseínicas, promover gelificação em tempo adequado e formar um coágulo com firmeza suficiente para corte e agitação, além de atender aos critérios regulatórios de pureza e segurança (IDF, 1990; Yegin & Dekker, 2013).

Atualmente, três principais grupos de substitutos do coalho são utilizados na fabricação de queijos: coagulantes de origem microbiana, quimosina produzida por fermentação e coagulantes de origem vegetal (Uniacke-Lowe & Fox, 2017). Os primeiros substitutos empregados em escala industrial foram proteinases microbianas, principalmente fúngicas, obtidas de espécies como *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* e *Cryphonectria parasitica*. Embora apresentem, em geral, menor relação entre atividade coagulante e proteolítica em comparação ao coalho animal, esses coagulantes são capazes de promover formação satisfatória da coalhada, tendo seu desempenho aprimorado por meio de ajustes nas condições de fermentação e nos processos de extração (Fox & Guinee, 2022).

O avanço das técnicas de biotecnologia e do DNA recombinante possibilitou a produção de proteínas de interesse em larga escala, incluindo a quimosina recombinante. No início da década de 1990, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso da quimosina recombinante no processamento do leite, e estima-se que esse tipo de coagulante represente atualmente cerca de 80% do mercado global de enzimas de coagulação do leite (Kumar et al., 2010). A Federação Internacional de Laticínios propôs o termo quimosina produzida por fermentação (QPF) para designar preparações obtidas a partir da fermentação por microrganismos hospedeiros, como *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Kluyveromyces lactis*. A QPF é molecularmente idêntica à quimosina de bezerro e apresenta desempenho tecnológico considerado ideal para a coagulação do leite. Seu uso futuro está relacionado, em parte, à aceitação de produtos derivados de organismos geneticamente modificados pelos consumidores, embora não existam evidências científicas que indiquem qualquer comprometimento de sua segurança (Fox & Guinee, 2022; McSweeney, 2022).

Restrições de natureza religiosa (como a proibição do uso de coalhos de origem suína ou de animais não abatidos segundo preceitos halal ou kosher), cultural (associadas à preferência por dietas vegetarianas) ou regulatória (relacionadas ao uso de ingredientes geneticamente modificados em determinados países) têm incentivado a pesquisa e o uso de proteases de origem vegetal. Essas enzimas, obtidas a partir de diferentes tecidos vegetais, como frutas, flores, caules e látex, apresentam propriedades catalíticas atrativas, com ampla variação de condições ótimas de pH e temperatura para a coagulação do leite (Mazorra-Manzano et al., 2018).

Apesar dos avanços no uso de enzimas vegetais alternativas, poucas fontes são adequadas para aplicação em escala comercial (Uniacke-Lowe & Fox, 2022). Nativa da Península Ibérica, as flores do cardo (*Cynara cardunculus* L.) (Figura 1), tem sido utilizada há séculos na produção de queijos artesanais, conferindo características sensoriais específicas, como sabor ligeiramente amargo e picante, além de textura amanteigada, alguns dos quais possuem selo de Denominação de Origem Protegida (Mazorra-Manzano et al., 2018; Uniacke-Lowe & Fox, 2022).



Figura 1. Flor do cardo (*Cynara cardunculus* L.)

Fonte: Próprio autor.

Os pistilos das flores do cardo são compostos majoritariamente pelas cardosinas A e B. O extrato bruto apresenta aproximadamente 75% de cardosina A e 25% de cardosina B, que apresentam similaridade de especificidade e atividade com a quimosina e a pepsina, respectivamente (Almeida et al., 2017; Alavi & Momen, 2020; Liburdi et al., 2018; Uniacke-Lowe & Fox, 2022). Diferenças na composição das caseínas entre leites bovino, ovino e caprino influenciam os perfis de peptídeos formados durante a coagulação, afetando as características sensoriais dos queijos (Uniacke-Lowe & Fox, 2022).

Os principais sítios de clivagem descritos para cardosinas e quimosina, considerando diferentes frações de caseína e tipos de leite, encontram-se resumidos na Tabela 1. Em comparação com a quimosina, as cardosinas apresentam maior atividade proteolítica em relação à atividade de coagulação, o que resulta em um espectro mais amplo de hidrólise nas demais frações caseínicas (Nuñez, 2022).

Além do cardo, outras espécies do gênero *Cynara*, como a alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*), também têm sido investigadas como fontes de proteases aspárticas com potencial aplicação na coagulação do leite. A alcachofra é originária da Europa Mediterrânea e faz parte da família *Asteraceae*. Trata-se de uma planta herbácea perene, robusta e de crescimento vigoroso. O termo alcachofra refere-se tanto à planta inteira quanto à sua inflorescência, cuja cabeça floral é amplamente consumida fresca ou processada, embora represente apenas uma pequena proporção da biomassa total da planta (Frutos et al., 2019).

Tabela 1. Principais ligações peptídicas clivadas por cardosinas e quimosina nas frações caseínicas de diferentes tipos de leite.

Fração	Tipo de Leite	Ligações clivadas	
		Cardosinas	Quimosina
κ-caseína	Bovina	Phe ₁₀₅ –Met ₁₀₆	Phe ₁₀₅ –Met ₁₀₆
	Caprina	Lys ₁₁₆ –Thr ₁₁₇	Lys ₁₁₆ –Thr ₁₁₇
αs1-caseína	Bovina	Phe ₂₃ –Phe ₂₄ ; Tyr ₁₅₃ –Tyr ₁₅₄ ; Trp ₁₆₄ –Tyr ₁₆₅ ; Tyr ₁₆₅ –Tyr ₁₆₆ ; Tyr ₁₆₆ –Val ₁₆₇ ; Phe ₁₄₅ –Tyr ₁₄₆ ; Leu ₁₄₉ –Phe ₁₅₀ ; Leu ₁₅₆ –Asp ₁₅₇ ; Ala ₁₆₃ –Trp ₁₆₄	Phe ₂₃ –Phe ₂₄
	Caprina	Phe ₂₃ –Val ₂₄ ; Trp ₁₆₄ –Tyr ₁₆₅ ; Tyr ₁₇₃ –Thr ₁₇₄	Phe ₂₃ –Phe ₂₄
αs2-caseína	Ovina	Phe ₈₈ –Tyr ₈₉ ; Ser ₉ –Ser ₁₀	Phe ₈₈ –Tyr ₈₉
	Caprina	Tyr ₁₇₉ –Leu ₁₈₀	Tyr ₁₇₉ –Leu ₁₈₀
β-caseína	Bovina	Ala ₁₈₉ –Tyr ₁₉₃ ; Leu ₁₂₇ –Thr ₁₂₈	Clivagem limitada na região Ala ₁₈₉ –Tyr ₁₉₃
	Ovina	Phe ₂₃ –Val ₂₄	Phe ₂₃ –Val ₂₄

Fonte: Macedo et al. (1996); Sousa & Malcata (1998); Nuñez (2022).

A alcachofra desempenha papel relevante na nutrição humana e na economia agrícola dos países da região mediterrânea. A Itália destaca-se como o maior produtor mundial, com área colhida de 46.440 ha e produção total de 451.461 toneladas em 2014, seguida pela Espanha e pela França, com produções de 234.091 e 38.354 toneladas, respectivamente (FAOSTAT, 2017). A menor variabilidade associada ao cultivo da alcachofra, em comparação com flores

silvestres, constitui uma vantagem para o preparo de substitutos do coalho. Além disso, a utilização de pequenas inflorescências que não atingem padrão comercial pode representar um benefício econômico para pequenos e médios produtores (Colombo et al., 2018), agregando valor à cadeia produtiva (Gostin & Waisundara, 2019).

Proteinases aspárticas isoladas das flores de alcachofra foram caracterizadas quanto à sua aplicação na produção de queijos (Llorente et al., 2004; Sidrach et al., 2005). Três proteinases, denominadas cardosinas A, B e C, foram purificadas e identificadas, apresentando atividade de coagulação do leite e comportamento semelhante ao das enzimas provenientes das flores do cardo, com ação predominante sobre a κ -caseína (Chazarra et al., 2007; Llorente et al., 2014; Esposito et al., 2016). As cardosinas A e B também são capazes de hidrolisar α - e β -caseínas, resultando em queijos com textura macia e amanteigada, aroma característico e sabor levemente picante (Llorente et al., 2014).



Figura 2. Flor da alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*)

Fonte: Próprio autor.

Estudos recentes demonstraram o potencial tecnológico do extrato da flor de alcachofra como coagulante vegetal. De Jesus et al. (2023) caracterizaram as proteases aspárticas da flor de alcachofra por espectroscopia no infravermelho médio e análises analíticas, evidenciando elevada atividade coagulante, baixa atividade proteolítica, alta razão de especificidade e estabilidade de armazenamento, além de perfis eletroforético, cromatográfico e espectroscópico compatíveis com sua aplicação na produção de queijos. Onelli et al. (2025) avaliaram o comportamento das proteases da flor de alcachofra na hidrólise da caseína de leite de búfala, demonstrando que, embora o extrato apresente sítios de clivagem distintos em relação à

quimosina microbiana, o rendimento na produção de queijos permaneceu inalterado, confirmando seu potencial tecnológico para essa matriz láctea.

De forma complementar, Crosetti et al. (2023) observaram atividade proteolítica do extrato liofilizado de flores de alcachofra em condições típicas de processamento, com rendimento satisfatório dos coágulos e sem degradação significativa das frações α - e β -caseínas. Resultados semelhantes foram reportados por Colombo et al. (2020), que verificaram alterações controladas na composição físico-química, na microestrutura e nas propriedades mecânicas dos queijos, mantendo qualidade microbiológica e boa aceitação sensorial. Mais recentemente, Onelli et al. (2026) demonstraram que o uso do extrato da flor de alcachofra na produção de queijos maturados de leite de búfala influencia a extensão da proteólise, o perfil proteômico e as características sensoriais ao longo da maturação, sem comprometer a qualidade tecnológica do produto, reforçando o potencial desse coagulante vegetal como alternativa à quimosina microbiana.

Os resultados disponíveis indicam que as proteases aspárticas da flor de alcachofra apresentam desempenho tecnológico compatível com sua aplicação como coagulantes vegetais, influenciando a cinética de coagulação, a proteólise e as propriedades físico-químicas e sensoriais dos queijos.

2.2 Coagulação enzimática do leite

A produção das diferentes variedades de queijo segue, em geral, um fluxograma de processamento semelhante, no qual etapas específicas são ajustadas de modo a conferir ao produto final características físico-químicas, sensoriais e tecnológicas desejadas (Figura 3).

Entre essas etapas, a coagulação das caseínas constitui o evento central da fabricação de queijos, pois promove a conversão irreversível do leite, originalmente um sistema coloidal líquido, em um gel semissólido capaz de reter gordura e outros constituintes do leite (Fox & Guinee, 2022; Jeantet et al., 2017). A subsequente sinérese desse gel, com expulsão parcial do soro, resulta na formação da coalhada, que será posteriormente moldada, prensada e maturada, dependendo da variedade de queijo produzida (Bennett, 2004).

A coagulação do leite pode ser obtida por diferentes mecanismos, incluindo acidificação, ação combinada de calor e acidez ou, mais comumente, por via enzimática. Embora queijos coagulados por ácido, como Quark e Cottage, e aqueles obtidos por aquecimento do soro, como Ricotta e Manouri, apresentem importância econômica regional, a coagulação enzimática responde por aproximadamente 75% da produção mundial de queijos,

sendo, portanto, o método predominante na indústria queijeira (Fox & Guinee, 2022). Esse processo baseia-se na ação de proteinases, em especial as proteinases aspárticas (EC 3.4.23), capazes de iniciar a proteólise específica necessária para a desestabilização das micelas de caseína (Horne & Lucey, 2017).

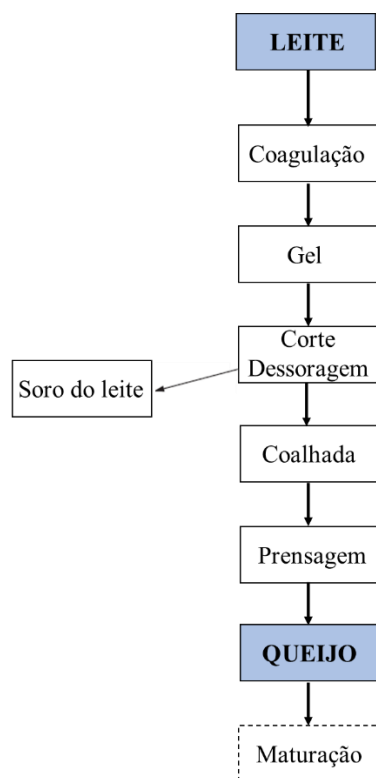


Figura 3. Fluxograma geral para fabricação de queijo.

Fonte: Próprio autor.

Do ponto de vista dos mecanismos envolvidos, a coagulação enzimática do leite pode ser descrita em duas fases principais: a fase primária, correspondente à hidrólise enzimática da κ -caseína, e a fase secundária, caracterizada pela agregação das micelas de caseína e formação do gel. Embora conceitualmente distintas, essas fases se sobrepõem parcialmente durante o processo de fabricação do queijo (Figura 4) (Jeantet et al., 2017).

Durante a fase primária da coagulação, a κ -caseína é hidrolisada pelo coagulante, tipicamente na ligação peptídica Phe₁₀₅–Met₁₀₆, formando para- κ -caseína, que permanece associada à micela, e um macropeptídeo hidrofílico, que se difunde para a fase aquosa. Essa clivagem resulta na perda da camada estabilizante da micela, tornando o sistema suscetível à agregação na presença de íons cálcio e a temperaturas geralmente superiores a 20 °C. Após um período de latência, inicia-se a fase secundária, na qual ocorre a associação das micelas

desestabilizadas e a formação de uma rede tridimensional contínua, caracterizando o coágulo do leite (Fox et al., 2015; Lucey, 2022; Nuñez, 2022).

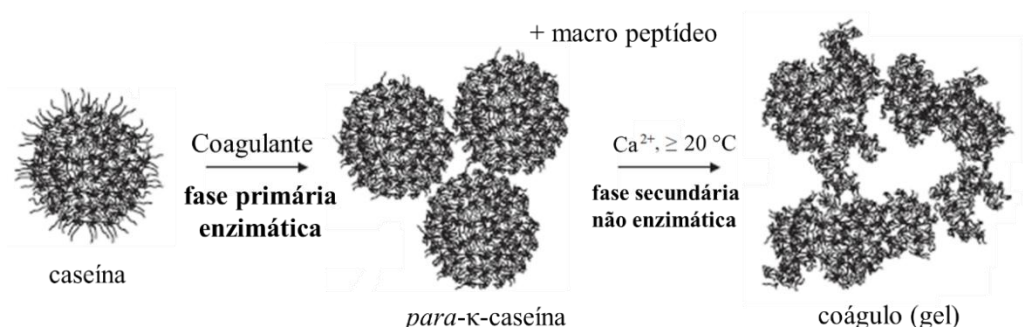


Figura 4. Resumo das duas etapas envolvidas na coagulação enzimática do leite.
Fonte: adaptado de (Jeantet et al., 2017).

Diversos fatores físico-químicos influenciam a cinética da coagulação enzimática e as propriedades do gel formado, incluindo a concentração de coagulante, a temperatura, o pH, a concentração de cálcio e a concentração total de proteínas no leite (Jeantet et al., 2017). Os principais efeitos desses fatores sobre o tempo de coagulação estão ilustrados na Figura 5.

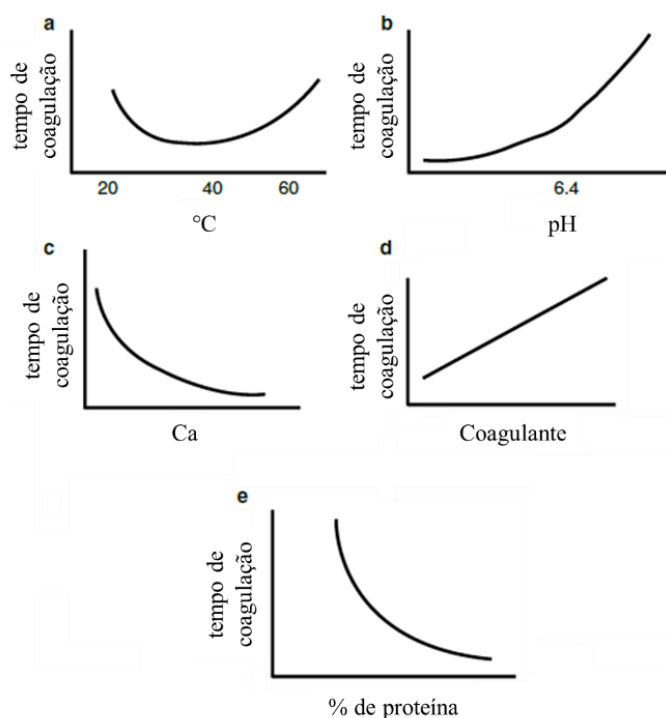


Figura 5. Principais fatores que afetam o tempo de coagulação do leite. a: temperatura (°C); b: pH; c: concentração de Ca; d: concentração de coagulante; e: concentração de proteína (%).
Fonte: adaptado de (Fox et al., 2015).

De modo geral, o aumento da concentração de coagulante reduz o tempo de coagulação, enquanto a elevação da temperatura acelera principalmente a fase secundária do processo. O pH exerce efeito mais pronunciado na fase primária, uma vez que a aproximação do pH do leite ao pH ótimo da enzima favorece a hidrólise da κ -caseína. Já o cálcio desempenha papel fundamental na fase de agregação, promovendo a formação de pontes entre micelas e contribuindo para o desenvolvimento da estrutura do gel (Fox et al., 2015).

2.3 Composição e papel tecnológico das proteínas do leite de diferentes espécies

A composição química do leite exerce influência determinante sobre o processamento tecnológico e a qualidade dos queijos, particularmente nas etapas de coagulação, formação do gel, sinérese da coalhada e rendimento final do produto. A composição do leite é influenciada por diversos fatores, incluindo espécie, raça, individualidade do animal, estado nutricional, saúde e estágio de lactação, resultando em ampla variabilidade nas características tecnológicas da matéria-prima (Fox et al., 2017).

Os macronutrientes do leite são, em termos qualitativos, semelhantes entre as diferentes espécies de mamíferos; contudo, diferenças quantitativas expressivas são observadas nas concentrações de gordura, proteínas, lactose e minerais (Tabela 2). Essas variações contribuem para diferenças no sabor, na textura e no rendimento dos queijos produzidos a partir dos diferentes tipos de leite (Roy et al., 2020).

Tabela 2. Composição geral dos diferentes tipos de leite.

Tipo de Leite	Gordura (g 100 mL ⁻¹)	Proteína (g 100 mL ⁻¹)	Lactose (g 100 mL ⁻¹)	Cinzas (g 100 mL ⁻¹)	Sólidos Totais (g 100 mL ⁻¹)
Vaca	3.3–5.4	3.0–3.9	4.4–5.6	0.7–0.8	11.8–13.0
Búfala	5.3–9.0	2.7–4.7	3.2–4.9	0.8–0.9	15.7–17.2
Cabra	3.0–7.2	3.0–5.2	3.2–5.0	0.7–0.9	11.9–16.3
Ovelha	5.0–9.0	4.5–7.0	4.1–5.9	0.8–1.0	18.1–20.0
Camela	2.0–6.0	2.4–4.2	3.5–5.1	0.69–0.9	11.9–15.0
Égua	0.3–4.2	1.4–3.2	5.6–7.2	0.3–0.5	9.3–11.6
Burra	0.3–1.8	1.4–2.0	5.8–7.4	0.3–0.5	8.8–11.7

Fonte: adaptado de (Roy et al., 2020).

Embora a proporção entre caseínas e proteínas do soro varie, o leite dos ruminantes apresenta predominância de caseínas, com proporções próximas a 80:20 (Tabela 3). Em contraste, leites de equinos apresentam proporções menores de caseína, o que se reflete em menor aptidão tecnológica para a fabricação de queijos (Gazi et al., 2022).

Tabela 3. Perfis proteicos dos diferentes tipos de leite.

Tipo de Leite	Caseína (g L ⁻¹)	Proteína do Soro (g L ⁻¹)	Proporção de caseína:proteína do soro de leite (g L ⁻¹)
Vaca	24.6–28	5.5–7.0	82:18
Búfala	32–40	6.0	82:18
Cabra	23.3–46.3	3.7–7.0	78:22
Ovelha	41.8–52.6	10.2–16.1	76:24
Camela	22.1–26.0	5.9–8.1	73:27–76:24
Égua	9.4–13.6	7.4–9.1	52:48
Burra	6.4–10.3	4.9–8.0	56:44

Fonte: adaptado de (Roy et al., 2020).

Entre as frações, a κ -caseína exerce papel fundamental na estabilidade coloidal do leite. Essa proteína localiza-se predominantemente na superfície das micelas e atua prevenindo a agregação espontânea das micelas. A concentração relativa de κ -caseína e sua distribuição influenciam diretamente a eficiência da coagulação enzimática e a força do gel formado (Rocha-Mendoza & Jiménez-Flores, 2022).

Durante a fase primária da coagulação enzimática, a κ -caseína é a única proteína hidrolisada, especificamente na ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ (Figura 6) (Fox et al., 2017).

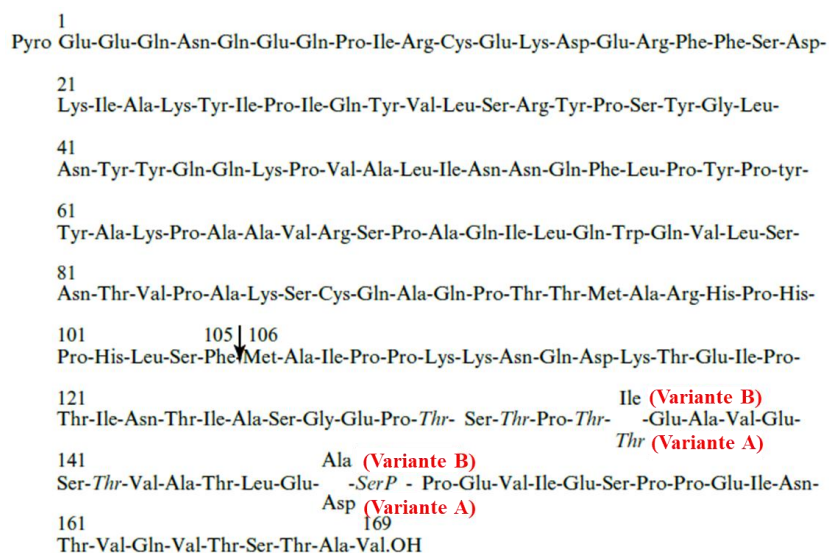


Figura 6. Sequência de aminoácidos da κ -caseína mostrando o sítio de clivagem da quimosina (seta para baixo).

Fonte: adaptado de (Fox et al., 2017).

Apesar de bem descrita, a sequência de κ -caseína na região da ligação suscetível à ação enzimática não é consistente entre as os diferentes tipos de leite (Figura 7). A κ -caseína da vaca, búfala, ovelha, cabra, camela, égua e burra possuem Phe na posição 105 (ou equivalente, após

alinhamento) e Ala na posição 107, mas o resíduo 106 pode ser Met ou Ile (Uniacke-Lowe & Fox, 2017).



	97		112
vaca	---R.H.P.H.P.H.L.S.	F.M.A.I.P.P.K.K---	
búfala	---R.H.P.H.P.H.L.S.	F.M.A.I.P.P.K.K---	
ovelha	---R.H.P.H.P.H.L.S.	F.M.A.I.P.P.K.K---	
cabra	---R.H.P.H.P.H.L.S.	F.M.A.I.P.P.K.K---	
camela	---R.R.P.R.P.R.P.S.	F.I.A.I.P.P.K.K---	
égua	---R.H.P.C.P.H.P.S.	F.I.A.I.P.P.K.K---	
burra	---R.H.P.R.P.H.P.S.	F.I.A.I.P.P.K.K---	

Figura 7. Sequência comparativa (alinhada) da região sensível à quimosina da κ -caseína de 7 tipos de leite. Os códigos de uma letra e os códigos de aminoácidos de três letras correspondentes são A, Ala; C, Cys; E, Glu; F, Phe; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met. Fonte: adaptado de (Uniacke-Lowe & Fox, 2017).

Além das diferenças no teor total de proteínas, variações expressivas são observadas na distribuição das frações de caseína (Tabela 4). De modo geral, as principais frações presentes no leite são α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseína, porém suas proporções relativas diferem entre ruminantes e não ruminantes. Essas diferenças influenciam o comportamento das micelas de caseína durante a coagulação e, conseqüentemente, a estrutura e a firmeza do gel formado (Rocha-Mendoza & Jiménez-Flores, 2022).

Tabela 4. Distribuição das frações de caseína no leite bovino, bubalino, caprino, ovino, equídeo, asinino e camelídeo.

Tipo de Leite	Fração de Caseína (%)				Referência
	α_{s1} -CN	α_{s2} -CN	β -CN	κ -CN	
Vaca	38	10	35	12	Van de Langerijt et al. (2022)
Búfala	40	6,3	35	12	Arora et al. (2022)
Cabra	5,6	19,2	54,8	20,4	Amigo & Fontecha (2022)
Ovelha	26	14	42	10	Gómez-Cortés & Amigo (2022)
Égua	20	10	65	5	Landi et al. (2021)
Burra	36	7,19	54,3	2,79	Papademas et al. (2022)
Camela	25,6	4,2	67	3,2	Kamal-Eldin et al. (2022)

As micelas de caseína também diferem entre os tipos de leite quanto ao tamanho, grau de hidratação e nível de mineralização (Tabela 5). De modo geral, leites de cabra, ovelha,

camela, égua e burra apresentam micelas de maior diâmetro em comparação ao leite bovino, o que pode afetar a cinética de agregação micelar, a firmeza do gel e a taxa de sinérese durante a coagulação enzimática (Roy et al., 2020).

Tabela 5. Características da caseína dos diferentes tipos de leite.

Tipo de Leite	Diâmetro da micela de caseína (nm)	Hidratação (g H ₂ O g proteína ⁻¹)
Vaca	150–182	1.92–3.7
Búfala	176–180	1.90
Cabra	180–301	1.43–2.05
Ovelha	180–210	1.71–1.93
Camela	380	1.70
Égua	255	Sem dados
Burra	100–200	~1.0

Fonte: adaptado de (Roy et al., 2020).

Devido à importância comercial da recuperação da gordura e da caseína na forma de coalhada, vários métodos têm sido utilizados para medir as propriedades de coagulação e formação de gel, ou seja, a combinação dos primeiro e segundo estágios, mas alguns monitoram especificamente a hidrólise da κ -caseína (Fox et al., 2017).

2.4 Avaliação da atividade coagulante e da cinética de formação do gel

Um dos principais fatores que justifica o elevado interesse no estudo da coagulação enzimática do leite é a otimização do tempo de corte do gel durante a fabricação de queijos. Quando o produtor decide que o gel (coágulo) atingiu firmeza suficiente, ele é cortado, sendo essa decisão tradicionalmente baseada em critérios empíricos relacionados ao teor de umidade desejado no produto final. O corte de géis ainda macios resulta em maior perda de soro e, consequentemente, em queijos com menor umidade, enquanto o corte de géis mais firmes está associado a maiores teores de umidade no queijo (Lucey, 2022).

Existem dois métodos tradicionais para a determinação da atividade de coagulação do leite, definida como a capacidade de hidrólise específica da κ -caseína (Jaros & Rohm, 2017). O método mais simples consiste na medição do tempo decorrido entre a adição de uma quantidade definida de coagulante a uma amostra de leite mantida em banho-maria com temperatura controlada (Figura 8). Durante a coagulação, observa-se a formação de flocos proteicos no interior do recipiente rotativo, permitindo a determinação visual do tempo de coagulação (Fox et al., 2015).

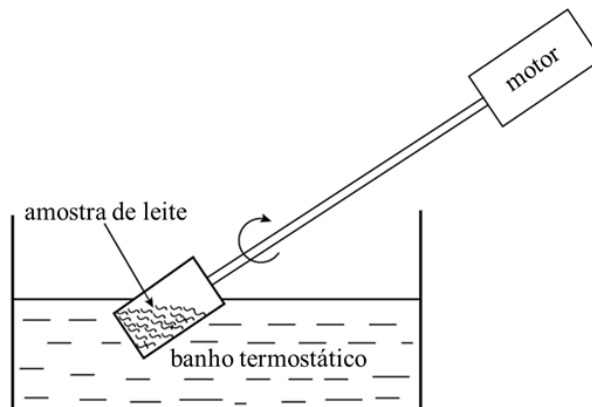


Figura 8. Esquema para determinação visual do tempo de coagulação.

Fonte: adaptado de (Fox et al., 2015).

Historicamente, a caracterização inicial dos coalhos industriais baseava-se na atividade total de coagulação do leite, denominada força do coalho. Essa atividade era expressa em unidades *Soxhlet*, definidas como o volume de leite coagulado por um determinado volume de coalho em 40 minutos a 35 °C. Entretanto, devido às variações na capacidade de coagulação do leite cru, essa definição mostrou-se insatisfatória. Posteriormente, foi proposta a unidade de *Berridge*, ou unidade de coalho (RU), utilizando leite em pó padronizado reconstituído em solução de CaCl₂. Essa unidade foi definida como a atividade capaz de coagular 10 mL de leite padronizado (pH 6,3) em 100 segundos a 30 °C. Apesar de amplamente utilizadas até a década de 1990, ambas unidades se tornaram imprecisas diante da diversidade de coalhos e coagulantes disponíveis no mercado (McSweeney, 2022).

A necessidade de métodos mais robustos e padronizados levou a Federação Internacional de Laticínios (IDF), em colaboração com a Organização Internacional de Normalização (ISO), a estabelecer uma série de normas para a determinação da composição e da atividade de coalhos e coagulantes. Esses métodos incluem a quantificação de quimosina e pepsina em coalhos (ISO 15163|IDF 110:2012), a determinação da atividade total de coagulação do coalho bovino (ISO 11815|IDF 157:2007), de coalhos ovinos e caprinos (ISO 23058|IDF 199:2006) e de coagulantes microbianos (ISO 15174|IDF 176:2012), além da avaliação da atividade lipolítica de preparações de esterase pré-gástrica (ISO 13082|IDF 218:2011). Em todos os casos, a atividade de coagulação é determinada em relação a padrões de referência de quimosina e pepsina bovinas, sendo os resultados expressos em Unidades Internacionais de Coagulação do Leite (IMCU mL⁻¹ ou IMCU g⁻¹).

Para o queijeiro interessado unicamente na potência da preparação enzimática, a atividade de coagulação pode constituir a principal grandeza de interesse (Jaros & Rohm, 2017).

Do ponto de vista físico-químico, entretanto, a coagulação do leite envolve uma sequência de eventos estruturais complexos que não são plenamente capturados apenas pela medição do tempo de coagulação. Assim, a utilização isolada desse parâmetro como indicador da aptidão do leite para a fabricação de queijos pode não fornecer informações suficientemente precisas (Auldist et al., 2004).

Quando aproximadamente 85% da κ -caseína total é hidrolisada, as micelas de caseína passam a se agregar progressivamente, formando uma rede tridimensional característica do gel. O início da gelificação é indicado por um aumento acentuado da viscosidade (η) do sistema (Figura 9). Durante os estágios iniciais da coagulação, a viscosidade do leite pode sofrer uma leve redução, atribuída à liberação de glicomacropéptidos (GMP), que resulta em diminuição do volume efetivo e da hidratação das micelas de caseína. Esse comportamento permite a utilização da viscosidade como um parâmetro indicativo do ponto de coagulação (Fox et al., 2015).

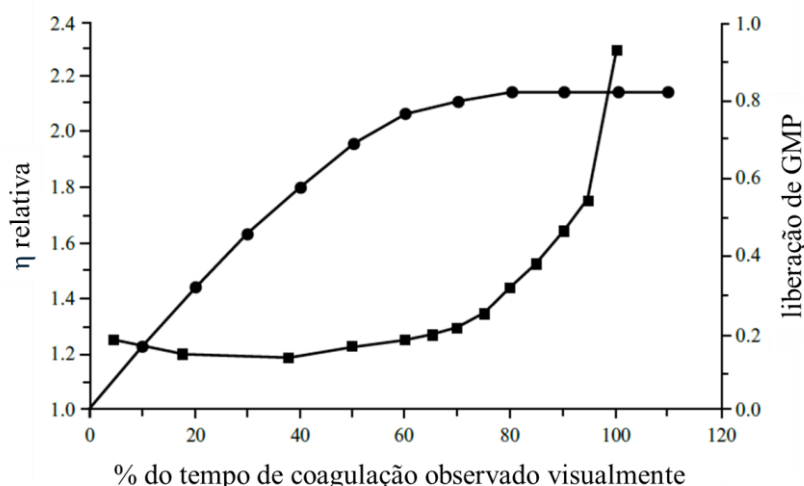


Figura 9. Representação esquemática da coagulação do leite. Liberação de macropéptidos (círculos preenchidos) e alterações na viscosidade relativa (quadrados preenchidos) durante o curso da coagulação do coalho.

Fonte: adaptado de (Fox et al., 2015).

A medição da viscosidade ou da firmeza do coágulo em um tempo fixo, por meio de viscosímetros ou texturômetros, pode ser utilizada para avaliar a coagulação do leite. No entanto, essa abordagem fornece informações limitadas, restritas a um único ponto no tempo, o que representa uma limitação importante em estudos cinéticos. Além disso, tais medições exigem condições experimentais rigorosas, uma vez que a resistência da coalhada aumenta continuamente após a coagulação (Fox et al., 2015).

Essa limitação torna inadequada a avaliação pontual da coagulação em processos nos quais o desenvolvimento temporal da firmeza do gel é determinante. Considerando que a coalhada é cortada apenas após atingir uma firmeza adequada, os métodos mais eficazes são aqueles capazes de monitorar continuamente o desenvolvimento da coalhada ao longo do tempo, acompanhando as mudanças em atributos físicos específicos do sistema (Jaros & Rohm, 2017).

As medições reológicas dinâmicas aplicam deformação ou tensão de cisalhamento oscilante de baixa amplitude, permitindo o cálculo dos parâmetros G' , G'' e do ângulo de fase δ . O início da gelificação é caracterizado pelo aumento simultâneo de G' e G'' e pela redução de δ , refletindo a transição do sistema de um comportamento predominantemente viscoso para um gel elástico. Embora G'' e δ forneçam informações sobre o comportamento viscoelástico, o módulo elástico G' constitui a medida direta da firmeza do gel, sendo particularmente relevante na fabricação de queijos (Fox et al., 2015).

O Latodinamografo® (Foss, Itália), que substituiu o Formagraph® (Foss Electric, Dinamarca) se baseia em um método mecânico/reológico. O sistema se baseia no campo eletromagnético criado pela oscilação de um pêndulo de aço inoxidável imerso na amostra de leite durante o processo de coagulação, registrando as alterações na viscosidade e elasticidade do leite, induzidas quando a enzima hidrolisa a κ -caseína (O'Callaghan et al., 2002).

O equipamento fornece parâmetros individuais que são considerados úteis para determinação das propriedades de coagulação do leite (Figura 10a). O tempo de coagulação (TC, min), obtido pela medição do intervalo do tempo zero (o momento da adição do coalho) até o momento em que a linha de base começa a se alargar, tempo para firmeza de 20 mm (k_{20} , min), que é o intervalo do início da formação do gel (TC) até o momento em que a largura de oscilação se torna 20 mm; a firmeza 30 min após a adição da enzima (a_{30} , mm), que corresponde à largura do gráfico 30 min após a adição do coalho (Bittante, et al., 2012).

O sinal detectado é amplificado e registrado, gerando diagramas em forma de “sinos” ou “taças de champagne”, chamados lactodinamogramas, expressos em firmeza do gel versus tempo de coagulação (O'Callaghan et al., 2002). A combinação dos três parâmetros TC, k_{20} e a_{30} é usada para classificar o leite como ideal (A), abaixo do ideal (B, C e D), fraco (E, F, DD) e sem coagulação (FF) (Figura 10b). (Bittante, et al., 2012).

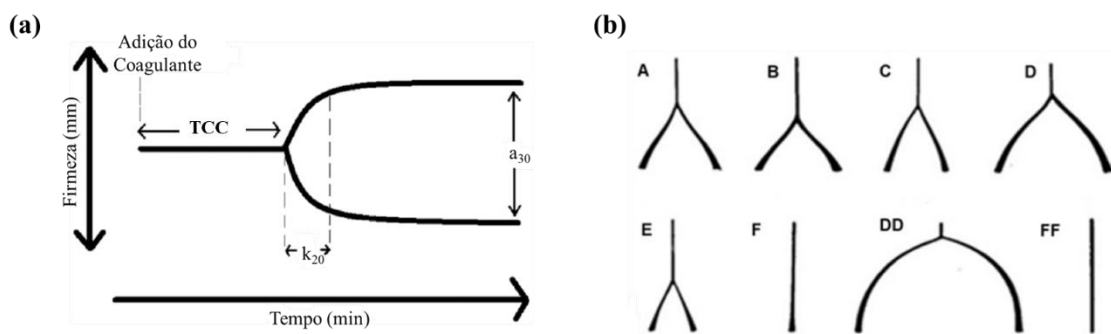


Figura 10. (a) Representação dos parâmetros lactodinamográficos. TC: tempo de coagulação (min); k_{20} : tempo para firmeza de 20 mm (min); a_{30} : firmeza 30 min após a adição da enzima (mm). (b) Classificação das curvas lactodinamográficas mais comuns. A: leite ideal; B, C e D: leite abaixo do ideal; E, F e DD: leite fraco; FF: leite sem coagulação.

Fonte: adaptado de (Annibaldi et al., 1977; Troch et al., 2017).

Embora os últimos parâmetros não tenham significado reológico preciso, o Lattodinamografo apresenta vantagens em relação ao tempo de coagulação, já que os resultados são menos subjetivos, sendo independentes do julgamento do operador, o método simula a formação de gel durante a fabricação de queijo e os parâmetros do teste fornecem mais informações sobre as mudanças na resistência da coalhada ao longo do tempo (Fox et al., 2015).

As medições obtidas por Optigraph® não correspondem a medições reológicas, sendo baseadas em sinalização óptica no infravermelho próximo (NIR) (Cipolat-Gotet et al., 2018). O equipamento calcula os parâmetros de coagulação por meio de pontos característicos extraídos das informações ópticas, que são processados para simular parâmetros tradicionais. A duração de um ciclo é definida pelo usuário (Kübarsepp et al., 2005).

Neste método, à medida que a coagulação evolui, a luz emitida que atravessa o leite é progressivamente atenuada devido a alterações que ocorrem na estrutura da micela de caseína. A firmeza do coágulo é medida em função da corrente (V) necessária para compensar a atenuação do sinal (Mahaut, 2000). São obtidos gráficos ou “optigramas” (Figura 11) construídos de acordo com a evolução do sinal ao longo da coagulação do leite.

É possível obter o tempo de início da coagulação (R, segundos); o parâmetro da consistência do gel, mede a intensidade do sinal óptico quando decorreu um tempo igual a 2R (AR, Volt); o parâmetro da consistência do gel, mede a intensidade do sinal óptico quando decorreu um tempo igual a 3R (A2R, Volt); o tempo necessário, a partir de R, até que se obtenha uma consistência padrão equivalente a 6,5 Volt (0K20 em segundos); a intensidade do sinal óptico quando decorridos 20 e 40 minutos, respectivamente, desde o início do ensaio (A_{20} e A_{40} , Volt) (Gomes et al., 2019)

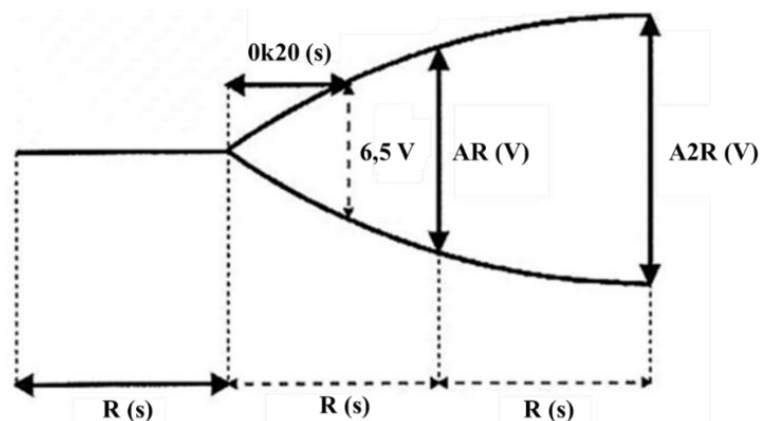


Figura 11. Esquema da representação gráfica tipo do Optigraph® e indicação dos parâmetros medidos pelo equipamento. R: tempo de início da coagulação (s); AR e A2R: consistência do gel para o dobro de R (V); consistência do gel para o triplo de R (V); 0K20: consistência padrão equivalente a 6,5 Volt (s); A₂₀ e A₄₀: intensidade do sinal óptico após 20 e 40 minutos do início do ensaio.

Fonte: adaptado de (Mahaut et al., 2000).

Apesar do potencial desse método, alguns parâmetros derivados, como 0K20, A₂₀ e A₄₀, apresentam variabilidade considerável e limitada significância prática. Assim, embora o uso de métodos ópticos represente uma abordagem promissora para o monitoramento da coagulação do leite, ainda são necessários avanços em termos de repetibilidade e robustez analítica para sua aplicação mais ampla (Bittante et al., 2012).

2.5 Metodologias analíticas para avaliação da hidrólise da κ -caseína e perfil proteico

O grau de hidrólise de κ -caseína pode ser monitorado por meio de diferentes métodos. A fase primária da ação do coagulante pode ser monitorada medindo-se a formação de para- κ -caseína ou macro peptídeo. A para- κ -caseína pode ser medida por eletroforese em gel SDS-PAGE, ou por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O macro peptídeo é solúvel em TCA 2-12%, dependendo do seu teor de carboidratos, e pode ser quantificado pelo método de Kjeldahl, pela determinação da concentração de ácido N-acetilneuramínico ou por CLAE (Fox et al., 2015).

O coagulante é o principal responsável pela proteólise primária, ou seja, pela hidrólise inicial das caseínas e pela formação de peptídeos solúveis em pH 4,6 (McSweeney, 2022). O grau de hidrólise da caseína pode ser expresso como a quantidade de proteína presente na fração de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (Cai et al., 2023). A hidrólise enzimática da κ -caseína pode ser avaliada medindo a liberação de caseinomacropeptídeo (CMP). Os sobrenadantes (supostamente contendo todos os macropeptídeos liberados de κ -caseína) são coletados e

usados para análise de CMP, usando a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) (Kayihura, 2023). Essa abordagem tem sido amplamente empregada para a caracterização da hidrólise da κ -caseína e do perfil peptídico em diferentes matrizes lácteas, incluindo estudos recentes que utilizaram cromatografia líquida em fase reversa para avaliar a ação de coagulantes vegetais em sistemas de leite e queijo de búfala (Onelli et al., 2025; Onelli et al., 2026).

Os produtos de proteólise secundária podem incluir peptídeos, proteínas e aminoácidos solúveis na fase aquosa do queijo e que podem ser extraídos como fração solúvel em água (Upadhyay et al., 2004). 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 (De Jesus et al., 2024).

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 (CLAE) e técnicas espectroscópicas vibracionais como infravermelho médio (MIR) (Gonçalves et al., 2017; De Jesus et al., 2020; De Jesus et al., 2024).

A UREIA-PAGE separa as proteínas com base na carga e é o meio preferido para resolver caseínas, enquanto na SDS-PAGE, a separação ocorre com base no tamanho, sendo pouco eficaz para separar caseínas devido à proximidade entre as massas moleculares das quatro principais caseínas. Devido à sua alta hidrofobicidade, a β -caseína possui maior afinidade pelo gel SDS comparado a α_{s1} -caseína e, portanto, apresenta maior mobilidade, embora seja a molécula maior. Para as proteínas do soro de leite, a SDS-PAGE fornece melhores resultados (Fox et al., 2015).

Técnicas espectroscópicas no infravermelho próximo (NIR) e médio (MIR) têm sido utilizadas para analisar as características físico-químicas e os tempos de maturação dos queijos, bem como para diferenciá-los de acordo com a região de origem (Cardoso et al., 2025).

A região do MIR (4000–400 cm^{-1}) fornece dados robustos e as bandas podem ser atribuídas a grupos funcionais específicos, fornecendo uma "impressão digital" da amostra (De Jesus et al., 2020). As moléculas absorvem energia do MIR e exibem vibrações em um ou mais locais no espectro o que auxilia na análise da composição e na determinação do perfil químico da amostra (Ayvaz et al., 2022). Segundo Silva et al. (2021), nos espectros de NIR as bandas

tendem a ser mais largas, menos intensas e mais sobrepostas em comparação à região do MIR, refletindo informações estruturais mais complexas decorrentes da excitação de combinações vibracionais e sobretons.

De Jesus et al. (2023) realizaram análise no MIR na caracterização das proteases aspárticas da flor de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*). Os grupos funcionais presentes na amostra absorveram mais energia que os demais coagulantes estudados, resultando em bandas mais intensas, principalmente na região da amida, que está relacionada à estrutura secundária de proteínas, indicando maior concentração desses compostos no extrato.

As aplicações da espectroscopia de infravermelho na pesquisa estão em constante crescimento, abrangendo desde a simples determinação de concentração até o monitoramento de alterações bioquímicas e estruturais complexas. Em queijo/coalhada, pode ser aplicada na análise de proteínas, perfil peptídico, nitrogênio total e frações de nitrogênio, estudo de alterações de maturação e controle de processo, como por exemplo, monitoramento de coagulação e sinérese (Ayvaz et al., 2022).

3. Referências

- 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.
- ALMEIDA, C. M.; MANSO, J. A.; FIGUEIREDO, A. C.; ANTUNES, L.; CRUZ, R.; MANADAS, B.; BUR, D.; PEREIRA, P. J. B.; FARO, C.; SIMÕES, I. Functional and structural characterization of synthetic cardosin B-derived rennet. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 6951–6968, 2017.
- AMIGO, L.; FONTECHA, J. Goat Milk. In: MCSWEENEY, P. L. H.; MCNAMARA, J. P. **Encyclopedia of dairy sciences**. 3ª ed. London, UK: Elsevier, 2022. p. 797-808.
- ANNIBALDI S.; FERRI G.; MORA R. Nuovi orientamenti nella valutazione tecnica del latte: tipizzazione lattodinamografica. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, v. 28, p. 115–126, 1977.
- ARORA, S.; SINDHU, J. S.; KHETRA, Y. Buffalo Milk. In: MCSWEENEY, P. L. H.; MCNAMARA, J. P. **Encyclopedia of dairy sciences**. 3ª ed. London, UK: Elsevier, 2022. p. 785-796.
- AULDIST, M. J.; JOHNSTON, K. A.; WHITE, N. J.; FITZSIMONS, W.P.; BOLAND, M. J. A comparison of the composition, coagulation characteristics and cheesemaking capacity of milk from Friesian and Jersey dairy cows. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p. 51–57, 2004.
- AYVAZ, H.; ZREYAS, A.; ZREYAS, V.; RODRIGUEZ-SAONA, L. Infrared Spectroscopy in Dairy Analysis. In: MCSWEENEY, P. L. H.; MCNAMARA, J. P. **Encyclopedia of dairy sciences**. 3ª ed. London, UK: Elsevier, 2022. p.405-420.

BENNETT, R. J. General Aspects of Cheese Technology. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. **Cheese: Chemistry, Physics & Microbiology**. 3^a ed. London, UK: Elsevier, 2004. p. 23-50.

BITTANTE, G.; PENASA, M.; CECCHINATO, A. Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 6843–6870, 2012.

CAI, H.; BIJL, E.; SCHOLTEN, E.; GUIDO, S. Effect of plasmin on casein hydrolysis and textural properties of rennet-induced model cheeses. **Food Research International**, v. 165, p. 112421, 2023.

CARDOSO, K. L. R.; JESUS, J. C.; DARGÈRE, A. F.; CAPELA, A. P.; OLIVEIRA, T. F.; CARVALHO, G. R.; SANTOS, L. S.; FARIA, P. B.; FERRÃO, S. P. B. Discrimination of artisanal Minas cheeses according to geographical origin using spectroscopic and chromatographic techniques associated with chemometrics. **Food Chemistry**, v. 484, 144466, 2025.

CHAZARRA, S.; SIDRACH, L.; LÓPEZ-MOLINA, D.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1393–1400, 2007.

CIPOLAT-GOTET, C.; PAZZOLA, M.; FERRAGINA, A.; CECCHINATO, A.; DETTORI, M. L.; VACCA, G. M. Improving modeling of coagulation, curd firming, and syneresis of sheep milk. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 7, p. 5832–5837, 2018.

COLOMBO, M.L.; CIMINO, C.V.; BRUNO, M. A.; HUGO A.; LIGGIERI, C.; FERNÁNDEZ, A.; VAIRO-CAVALLI, S. Artichoke cv. Francés flower extract as a rennet substitute: effect on textural, microstructural, microbiological, antioxidant properties, and sensory acceptance of miniature cheeses. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, p. 1382-1388, 2020.

COLOMBO, M.L.; FERNÁNDEZ, A.; CIMINO, C.V.; LIGGIERI, C.; BRUNO, M.; FARO, C.; VERÍSSIMO, P.C.; VAIRO-CAVALLI, S. 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.

CROSETTI, V.; SOLA, A.; GRIGIONI, G.; TORRES, M. J. Milk-Clotting Properties and Primary Proteolysis of a Lyophilised Extract from Artichoke Flowers (*Cynara scolymus* L.). **Food Technology and Biotechnology**, v. 61, p. 402-409, 2023.

DE JESUS, J. C.; REIS, L. C. C.; SANTOS, M. P. F.; SANTOS, L. S.; FERRÃO, S. P. B. Chemical characterization of aspartic protease from artichoke flower (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*) using MIR spectroscopy and analytical measurements. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 34, p. 1520-1530, 2023.

DE JESUS, J. C.; SILVA, G. J.; GONÇALVES, B. H. R. F.; SOUZA, M. R.; SANTOS, L. S.; FERRÃO, S. P. B. 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, p. 2000–2011, 2020.

DE JESUS, J. C.; TOLENTINO, I. C. S. A.; REIS, L. C. C.; CONCEIÇÃO, D. G.; ONELLI, R. R. V.; SANTOS, L. S.; FERRÃO, S. P. B. Biofunctional, chemical and sensory profile of mature cheese produced with artichoke flower coagulant (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*). **International Dairy Journal**, v. 156, p. 105976, 2024.

ESPOSITO, M.; DI PIERRO, P.; DEJONGHE, W.; MARINIELLO, L.; PORTA, R. 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.

FAOSTAT (Food and agriculture data), 2017. Statistical Database. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>

FOGEIRO, É.; BARRACOSA, P.; OLIVEIRA, J.; WESSEL, D. F. Influence of cardoon flower (*Cynara cardunculus* L.) and flock lactation stage in PDO Serra da Estrela cheese. **Foods**, v. 9, n. 4, p. 386, 2020.

FOX, P. F.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. Factors That Affect the Quality of Cheese. In: MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F.; COTTER, P. D.; EVERETT, D. W. **Cheese Chemistry, Physics & Microbiology**. 4^a ed. London, UK: Elsevier, 2017. p. 617-641.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P. Overview of Cheese. In: MCSWEENEY, P. L. H.; MCNAMARA, J. P. **Encyclopedia of dairy sciences**. 3^a ed. London, UK: Elsevier, 2022. p. 250-261.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. 2^a ed. London, UK: Elsevier, 2017. p. 71-103; 185-229.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. Cheese: An Overview. In: MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F.; COTTER, P. D.; EVERETT, D. W. **Cheese Chemistry, Physics & Microbiology**. 4^a ed. London, UK: Elsevier, 2017. p. 5-21.

FOX, P. F.; UNIACKE-LOWE, T.; MCSWEENEY, P. L. H.; O'MAHONY, J. A. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 2^a ed. London, UK: Elsevier, 2015. p. 499-546.

FRUTOS, M. J.; RUIZ-CANO, D.; VALERO-CASES, E.; ZAMORA, S.; PÉREZ-LLAMAS, F. Artichoke (*Cynara scolymus* L.). In: NABAVI, S. M.; SILVA, A. S. **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**. 1^a ed. London, UK: Elsevier, 2019. p. 135-138.

GÓMEZ-CORTÉS, P.; AMIGO, L. Sheep Milk. In: MCSWEENEY, P. L. H.; MCNAMARA, J. P. **Encyclopedia of dairy sciences**. 3^a ed. London, UK: Elsevier, 2022. p. 676-687.

GONÇALVES, B. H. R. F.; SILVA, G. J.; CONCEIÇÃO, D. G.; EGITO, A. S.; FERRÃO, S. P. B. Buffalo mozzarella chemical composition and authenticity assessment by electrophoretic profiling. **Semina - Ciências Agrárias**, v. 38, p. 1841–1851, 2017.

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

HORNE, D. S.; LUCEY, J. A. Rennet-Induced Coagulation of Milk. In: MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F.; COTTER, P. D.; EVERETT, D. W. **Cheese Chemistry, Physics & Microbiology**. 4^a ed. London, UK: Elsevier, 2017. p. 53-67.

INGE GAZIA, I.; JOHANSEN, L. B.; HUPPERTZ, T. Heterogeneity, Fractionation, and Isolation. In: MCSWEENEY, P. L. H.; MCNAMARA, J. P. **Encyclopedia of dairy sciences**. 3^a ed. London, UK: Elsevier, 2022. p. 881-893.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. (2024). **The World Dairy Situation Report 2024** (Bulletin of the IDF n° 532/2024).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Standard of identity for rennet and rennet substitutes**. Bulletin of the IDF, n. 251, Brussels: IDF, 1990.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION/INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. ISO 11815 | IDF 157:2007 — **Milk — Determination of total milk-clotting activity of bovine rennets**. Geneva: ISO; Brussels: IDF, 2006.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION/INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. ISO 23058 | IDF 199:2006 — **Milk — Determination of total milk-clotting activity of ovine and caprine rennets**. Geneva: ISO; Brussels: IDF, 2006.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION/INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. ISO 15174 | IDF 176:2012 — **Milk and milk products — Determination of milk-clotting activity of microbial rennets**. Geneva: ISO; Brussels: IDF, 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION/INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. ISO 15163 | IDF 110:2012 — **Milk and milk products — Determination of chymosin and bovine pepsin contents in rennets by chromatographic methods**. Geneva: ISO; Brussels: IDF, 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION; INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. ISO 13082 | IDF 218:2011 — **Milk and milk products — Determination of lipase activity of pregastric esterase preparations**. Geneva: ISO; Brussels: IDF, 2011.

JAROS, D.; ROHM, H. Milk coagulation. In: MCSWEENEY, P. L. H.; MCNAMARA, J. P. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 3rd ed. London, UK: Elsevier, 2017. p. 781–788.

JEANTET, R.; CROGUENNEC, T.; GARRIC, G.; BRULÉ, G. **Initiation à la technologie fromagère**. 2^a ed. Editions Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 2017, 210 p.

KAMAL-ELDIN, A.; AYYASH, M.; SOBTI, B.; NAGY, P. Camel Milk. In: MCSWEENEY, P. L. H.; MCNAMARA, J. P. **Encyclopedia of dairy sciences**. 3^a ed. London, UK: Elsevier, 2022. p. 504-513.

KAYIHURA, J. F. Extent of κ -casein hydrolysis during renneting of bovine milk: A critical assessment of the analytical and estimation approaches. **Food Science and Nutrition**, v. 12, p. 1399-1412, 2024.

KÜBARSEPP, I.; HENNO, M.; KÄRT, O.; TUPASELA, T. A comparison of the methods for determination of the rennet coagulation properties of milk. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section A – Animal Science**, v.55, p.145-148, 2005.

KUMAR, A.; GROVER, S.; SHARMA, J.; BATISH, V. K. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, p. 243–258, 2010.

LANDI, N.; RAGUCCI, S.; DI MARO, A. Amino Acid Composition of Milk from Cow, Sheep and Goat Raised in Ailano and Valle Agricola, Two Localities of ‘Alto Casertano’ (Campania Region). **Foods**, v. 10, p. 2431, 2021.

LIBURDI, K.; EMILIANI SPINELLI, S.; BENUCCI, I.; LOMBARDELLI, C.; ESTI, M. 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.

LIU, X.; WU, Y.; GUAN, R.; JIA, G.; MA, Y.; ZHANG, Y. Advances in research on calf rennet substitutes and their effects on cheese quality. **Food Research International**, v. 149, p. 110704, 2021.

LLORENTE, B. E.; OBREGÓN, W. D.; AVILÉS, F. X.; CAFFINI, N. O.; VAIRO-CAVALLI, S. 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.

LLORENTE, B.E.; BRUTTI, C.B.; CANI, 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, p. 8182–8189, 2004.

LUCEY, J. A. Rennet Coagulation of Milk. In: MCSWEENEY, P. L. H.; MCNAMARA, J. P. **Encyclopedia of dairy sciences**. 3^a ed. London, UK: Elsevier, 2022. p. 309-315.

LUO, J.; XIAO, C.; ZHANG, H.; REN, F.; LEI, X.; YANG, Z.; YU, Z. Characterization and milk coagulating properties of *Cynanchum otophyllum* Schneid. proteases. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 2842–2850, 2018.

MACEDO, I.Q.; FARO, C.J.; PIRES, E.V. Caseinolytic specificity of cardosin, an aspartic protease from the cardoon *Cynara cardunculus* L.: action on bovine α - and β -casein and comparison with chymosin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 42-47, 1996.

MAHAUT, M.; JEANTET, R.; BRULÉ, G. **Initiation à la technologie fromagère**. 1^a ed. Editions Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 2000.

MAZORRA-MANZANO, M. A.; MORENO-HERNÁNDEZ, J. M.; RAMÍREZ-SUAREZ, J. C. Milk-Clotting Plant Proteases for Cheesemaking. In: GUEVARA, M. G.; DALEO, G. R. **Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes**, 1^a ed. London, UK: Elsevier, 2018. p. 21-41.

MCSWEENEY, P. Rennets and Coagulants. In: MCSWEENEY, P. L. H.; MCNAMARA, J. P. **Encyclopedia of dairy sciences**. 3^a ed. London, UK: Elsevier, 2022. p. 316-320.

MCSWEENEY, P.L.H. Biochemistry of Cheese Ripening. In: MCSWEENEY, P. L. H.; MCNAMARA, J. P. **Encyclopedia of dairy sciences**. 3^a ed. London, UK: Elsevier, 2022. p. 22-29.

MOHSIN, A. Z.; NORSAH, E.; MARZLAN, A. A.; ABD RAHIM, M. H.; MEOR HUSSIN, A. S. Exploring the applications of plant-based coagulants in cheese production: A review. **International Dairy Journal**, v. 148, p. 105792, 2024.

NUÑEZ, M. Enzymes Exogenous to Milk in Dairy Technology: Proteinases. In: MCSWEENEY, P. L. H.; MCNAMARA, J. P. **Encyclopedia of dairy sciences**. 3^a ed. London, UK: Elsevier, 2022. p. 648-655.

O'CALLAGHAN, D. J.; O'DONNELL, C. P.; PAYNE, F. A. Review of systems for monitoring curd setting during cheesemaking. **International Journal of Dairy Technology**, v.55, p.65-74, 2002.

ONELLI, R. R. V.; JESUS, J. C.; LINS, R. P.; CAPELA, A. P.; SOARES, L. S.; FERRÃO, S. P. B. Technological innovation in the production of matured buffalo cheese using artichoke flower extract (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) as a coagulant: organic acid profile, proteomic and sensory study. **International Dairy Journal**, v. 173, 106491, 2026.

ONELLI, R. R. V.; JESUS, J. C.; OLIVEIRA, T. F.; ALCÂNTARA, L. R.; BONOMO, R. C. F.; SANTOS, L. S.; FERRÃO, S. P. B. Behavior of aspartic proteases from artichoke flower (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) in the hydrolysis of buffalo milk casein. **Journal of Food Science**, v. 90, e70773, 2025.

PAPADEMAS, P.; ASPRI, M.; MALISSIOVA, E.; FANTUZ, F.; SALIMEI, E. Donkey Milk. In: MCSWEENEY, P. L. H.; MCNAMARA, J. P. **Encyclopedia of dairy sciences**. 3^a ed. London, UK: Elsevier, 2022. p. 522-529.

PAPADEMAS, P.; BINTSIS, T. Cheese from Non-Bovine Milk. In: MCSWEENEY, P. L. H.; MCNAMARA, J. P. **Encyclopedia of dairy sciences**. 3^a ed. London, UK: Elsevier, 2022. p. 91-100

ROY, D.; YE, A.; MOUGHAN, P. J.; SINGH, H. Composition, Structure, and Digestive Dynamics of Milk from Different Species—A Review. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, p. 577759, 2020.

SIDRACH, L.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; TUDELA, J.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N. Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus* L.): Enzymatic properties of cynarase A. **Phytochemistry**, v. 66, p. 41–49, 2005.

SILVA, L. K. R.; JESUS, J. C.; ONELLI, R. R. V.; CONCEIÇÃO, D. G.; SANTOS, L. S.; FERRÃO, S. P. B. Discriminating Coalho cheese by origin through near and middle infrared spectroscopy and analytical measures. **International Journal of Dairy Technology**, v. 74, n. 2, p. 393–399, 2021.

SOUSA, M. J.; MALCATA, F. X. Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extracts of *Cynara cardunculus* cheese. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 305–314, 1998.

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.

TROCH, T.; LEFÉBURE, E.; BAETEN, V.; COLINET, F.; GENGLER, N.; SINDIC, M. Cow milk coagulation: process description, variation factors and evaluation methodologies. A review. **Biotechnology, Agronomy and Society and Environment**, v. 21, p. 276-287, 2017.

UNIACKE-LOWE, T.; FOX, P. F. Chymosin, Pepsins and Other Aspartyl Proteinases: Structures, Functions, Catalytic Mechanism and Milk-Clotting Properties. In: MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F.; COTTER, P. D.; EVERETT, D. W. **Cheese Chemistry, Physics & Microbiology**. 4^a ed. London, UK: Elsevier, 2017. p. 69-112.

UNIACKE-LOWE, T.; FOX, P. F. Equid Milk. In: MCSWEENEY, P. L. H.; MCNAMARA, J. P. **Encyclopedia of dairy sciences**. 3^a ed. London, UK: Elsevier, 2022. p. 543-546

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2024. **2023/2024 Cheese Production**. Washington, DC: USDA Foreign Agricultural Service, Dec. 2025. Disponível em: <https://fas.usda.gov/data/production/commodity/0240000>.

UPADHYAY, V. K.; MCSWEENEY, P. L. H.; MAGBOUL, A. A. A.; FOX, P. F. Proteolysis in cheese during ripening. In: MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F.; Cotter, P. D.; Everett, D. W. **Cheese: Chemistry, physics and microbiology**. 3^a ed. London, UK: Elsevier, 2004. p. 391-434.

VAN DE LANGERIJT, T. M.; CROWLEY, S. V.; O'MAHONY, J. A.; FOX, P. F. Bovine Milk. In: MCSWEENEY, P. L. H.; MCNAMARA, J. P. **Encyclopedia of dairy sciences**. 3^a ed. London, UK: Elsevier, 2022. p.778-783.

WANG, X.; SHI, Y.; HE, R.; LI, B.; HUANG, A. 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.

YEGIN, S.; DEKKER, P. Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. **Dairy Science & Technology**, v. 93, p. 565–594, 2013.

CAPÍTULO II: Objetivos

Objetivos

Objetivo geral

Investigar o comportamento enzimático e tecnológico de extrato da flor de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) para a coagulação de leites de diferentes espécies, como alternativa aos coagulantes comerciais da flor de cardo (*Cynara cardunculus* L.) e convencionais.

Objetivos específicos

- Obter e caracterizar o perfil enzimático do extrato da flor de alcachofra em comparação com extratos da flor do cardo e coagulantes convencionais, para investigar diferenças na aplicação tecnológica em leites de diferentes espécies;
- Avaliar a aplicação do extrato da flor de alcachofra sobre o rendimento e sinerese durante a produção de queijos frescos a partir de leites de diferentes espécies;
- Avaliar o grau de hidrólise da caseína e o perfil proteico dos coágulos, visando compreender as modificações estruturais decorrentes do perfil enzimático;
- Investigar a influência do tipo de coagulante sobre as propriedades físicas da coalhada formada pelo extrato da flor de alcachofra, coagulantes comerciais da flor de cardo e coagulantes convencionais;
- Avaliar o desempenho tecnológico de queijos frescos produzidos a partir do extrato da flor de alcachofra em comparação com coagulantes comerciais da flor de cardo e convencionais.

CAPÍTULO III: Investigação do comportamento enzimático e tecnológico durante a coagulação do leite de diferentes espécies utilizando extrato da flor de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) e cardo (*Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris*)

Investigação do comportamento enzimático e tecnológico durante a coagulação do leite de diferentes espécies utilizando extrato da flor de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) e cardo (*Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris*)

Arthur P. da Capela^a, Rebeca R. V. Onelli^a, Josane C. de Jesus^b, Cristina M. dos S. Conceição^c, Sibelli P. B. Ferrão^a

^a Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, Brasil

^b Departamento de Ciência dos Alimentos, Escola de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil

^c Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development & CHANGE – Global Change and Sustainability Institute, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Évora, Portugal

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

Resumo

Os leites de diferentes espécies apresentam composições distintas, o que afeta diretamente sua aptidão tecnológica. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade de coagulação do leite (ACL), a atividade proteolítica (AP), as propriedades de coagulação (Optigraph®) e o rendimento potencial de fabricação de queijos a partir de diferentes tipos de leite (vaca, búfala, cabra, ovelha, camela, égua e burra), utilizando extratos das flores de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) e cardo (*Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris*). A caracterização dos coágulos foi realizada por espectroscopia no infravermelho médio (MIR) e cromatografia (CLAE-FR). Os extratos vegetais apresentaram desempenho dependente da espécie de leite, com maior ACL nos leites de ovelha (184–248 IMCU mL⁻¹), cabra (99–214 IMCU mL⁻¹) e búfala (88–192 IMCU mL⁻¹). A atividade proteolítica (AP) não variou entre os tipos de leite para o extrato de alcachofra e foi maior para o extrato de cardo no leite de cabra (5,70 g NPN 100 g⁻¹ Nt). Os leites de égua e burra não coagularam nas condições experimentais, enquanto o leite de camela apresentou coagulação caracterizada por baixa firmeza do gel (menores valores de A₄₀) e elevada sinerese (> 90%). Os maiores rendimentos foram observados para o leite de ovelha (7,15–7,43 g 100 g⁻¹), independentemente do coagulante. O MIR não evidenciou diferenças no perfil dos coágulos. Os perfis cromatográficos da fração proteica solúvel em pH 4,6 demonstraram que o tipo de coagulante determinou a extensão e o padrão da proteólise primária, com maior intensidade proteolítica para o extrato de cardo, especialmente nos leites de búfala e camela. Os resultados indicam que os coagulantes vegetais do gênero *Cynara* apresentam melhor aptidão tecnológica para os leites de ovelha, cabra e búfala. A seleção do coagulante deve, portanto, considerar a espécie de leite e o perfil tecnológico desejado.

Palavras-chave: coagulantes vegetais, propriedades de coagulação do leite, firmeza da coalhada, sinerese.

1. Introdução

O suprimento mundial de leite é fornecido por algumas espécies, com destaque para os bovinos, que representam 83% da produção global. Os búfalos contribuem com 13%, caprinos com 2%, ovinos com 1%, enquanto a contribuição do leite de camelos e equinos é inferior a 0,5% (Papademas et al., 2023; FAO, 2025). A composição e propriedades físico-químicas do leite de diferentes espécies, principalmente as concentrações de caseína e gordura, têm grande influência no desempenho tecnológico do leite, incluindo a etapa de coagulação, a força do gel, a sinerese da coalhada e, conseqüentemente, a composição e o rendimento do queijo (Fox et al., 2017). Dessa forma, a diversidade composicional do leite exerce papel determinante na eficiência da coagulação e, assim, no rendimento e nas características finais do queijo.

A coagulação do leite resulta da ação específica de proteases aspárticas sobre a ligação peptídica Phe₁₀₅-Met₁₀₆ na κ -caseína, provocando a desestabilização das micelas e a subsequente agregação, resultando na transformação do leite em coalhada (Ghribi et al., 2022). Essas proteases eram tradicionalmente extraídas do abomaso (quarto estômago) de ruminantes jovens. No entanto, o aumento na produção dos derivados lácteos, especialmente o queijo, aliado à redução no fornecimento de coalho de vitelo, incentivou a exploração de novas fontes alternativas de coagulantes, como as proteases de origem vegetal (Bathmanathan et al., 2019; Li et al., 2024).

Dentre essas alternativas vegetais, o extrato das flores do cardo (*Cynara cardunculus* L.) é o mais utilizado na fabricação de queijos (Gostin & Waisundara, 2019). As flores do cardo contêm proteases aspárticas, como a cardosina A e B, que apresentam semelhança com a quimosina e a pepsina, respectivamente, tanto em termos de atividade quanto de especificidade sobre a κ -caseína e outras frações da caseína (Liburdi et al., 2019; Manuelian et al., 2020). A presença dessas proteases está associada ao uso do extrato de cardo na produção de diversos queijos de leite de ovelha e cabra, alguns deles com selo de Denominação de Origem Protegida (DOP) em Portugal, Espanha e Itália (Rampanti et al., 2023), servindo como referência para a prospecção de outros coagulantes vegetais do mesmo gênero com potencial tecnológico comparável.

De forma semelhante, as proteases aspárticas da flor da alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) foram isoladas e demonstraram atividade de coagulação do leite comparável às enzimas presentes nas flores de cardo, sendo o extrato de flores de alcachofra relatado como um substituto eficaz do coalho na produção de queijos (Colombo et al., 2020; Crosetti et al.,

2023; De Jesus et al., 2024; Onelli et al., 2026). Esses coagulantes podem atender não apenas ao mercado lacto-vegetariano, *Halal* e *Kosher*, mas também a demanda por queijos com composição e perfis sensoriais distintos (Fresno et al., 2023). Dessa forma, seu uso como coagulante para a produção de queijo representa uma alternativa para os produtores e pode agregar valor ao produto (Gostin & Waisundara, 2019). No entanto, a aplicação do extrato de flores de alcachofra em diferentes matrizes ainda não foi totalmente explorada.

Embora diversos autores tenham demonstrado que o tipo e a composição do leite influenciam o desenvolvimento do coágulo, bem como o rendimento e a qualidade do queijo, estudos envolvendo múltiplas espécies de leite e diferentes coagulantes vegetais ainda são limitados (Liburdi et al., 2019; Mozzon et al., 2020; Bittante et al., 2022). Nesse contexto, a determinação do grau de hidrólise da caseína (Cai et al., 2024), em conjunto com técnicas espectroscópicas vibracionais e a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (Kayihura, 2024; Onelli et al., 2025), tem sido empregada para relacionar a extensão e o perfil da proteólise primária à especificidade da ação enzimática e ao desempenho tecnológico de diferentes tipos de leite.

O presente estudo teve como objetivo avaliar as atividades enzimáticas dos extratos das flores de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) e cardo (*Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris*), seus efeitos na estimativa do rendimento de queijo e nas propriedades de coagulação de diferentes tipos de leite, bem como caracterizar os coágulos formados por espectroscopia no infravermelho médio (MIR) e cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR).

2. Materiais e Métodos

2.1 Agentes coagulantes

Flores de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) foram obtidas comercialmente de plantas cultivadas em São Roque (São Paulo, Brasil) (23°3'1045"S, 47°08'07" W). Como referência, foram utilizadas flores de cardo (*Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris*) de plantas colhidas na região do Alto Alentejo (Campo Maior, Portugal) (39°0'36"N, 7°4'5" W) e quimosina recombinante (*Aspergillus niger* var. *awamori*) (HÁ-LA®, Chr. Hansen, Brasil).

Para a produção dos extratos vegetais, 35 g de pistilos (flor de alcachofra ou flor de cardo) secos a 25 °C ± 1 °C foram moídos em um almofariz e adicionados 500 mL de água

destilada. Essa mistura permaneceu em repouso por 24 horas à $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, ao abrigo da luz. Os extratos foram filtrados em papel filtro quantitativo (Unifil, C40, 18,5 cm) (De Jesus et al., 2023).

2.2 Obtenção e preparo das amostras de leite

Leite em pó integral instantâneo de vaca (Nestlé, Portugal) e leite em pó integral instantâneo de camela (Aadvik, Delhi, Índia) foram adquiridos em Évora (Portugal). Leite em pó integral de cabra e ovelha ENS International B.V. (Heerhugowaard, Holanda) e o leite em pó integral de burra foi doado pela Asinus Atlanticus SA (Angra do Heroísmo, Portugal). As amostras foram mantidas nas embalagens originais e armazenadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até as análises.

O leite de égua foi coletado de animais da raça mangalarga machador da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* Itapetinga (Bahia, Brasil) ($14^{\circ}52'30''\text{ S}$, $41^{\circ}30'0''\text{ W}$) e o leite de búfala foi fornecido por um laticínio local no sudoeste da Bahia (Laticínios Garota, Bahia, Brasil) ($15^{\circ}15'10''\text{ S}$, $40^{\circ}37'09''\text{ W}$). Ambos foram pasteurizados ($64\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}/30\text{ min}$) e secos por atomização em um mini spray dryer (H-Spray Mini, Haurok, Estados Unidos da América) em fluxo co-corrente com temperatura do ar de entrada do secador de $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ e saída de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, bico de injeção de 1 mm, fluxo de ar de 40 L min^{-1} , fluxo de ar de secagem de $2,8\text{ m}^3\text{ min}^{-1}$ e fluxo da bomba de $1,04\text{ L h}^{-1}$, de acordo com Conceição et al. (2024). As amostras foram embaladas em uma seladora a vácuo modelo BS320 (R. Baião Brasil, LTDA) em embalagens de filme laminado (Incoplast, Grupo Copobras, Brasil) e armazenadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até as análises.

Os diferentes leites em pó foram reconstituídos a 11% com $0,5\text{ g L}^{-1}$ de solução de CaCl_2 (pH 6,5) em agitador magnético (114, Ethik Technology, São Paulo, Brasil). Após a dissolução completa, o leite foi filtrado em papel filtro qualitativo (Unifil, 80 g/m^2 , 11 cm) e usado no mesmo dia.

2.3 Caracterização dos extratos vegetais

2.3.1 Atividade de coagulação do leite

A atividade de coagulação do leite (ACL) foi avaliada de acordo com a ISO 23058/IDF 199 (ISO/IDF, 2006), usando as diferentes amostras de leite em pó como substrato (seção 2.2). Para os cálculos foram utilizados coalho de bezerro ($> 98\%$ de quimosina; $< 2\%$ de pepsina) e coalho bovino adulto ($< 2\%$ de quimosina; $> 98\%$ de pepsina) em pó (Chr. Hansen, Dinamarca).

Os resultados foram apresentados em unidades internacionais de coagulação do leite por mililitro (IMCU mL⁻¹). Amostras que não apresentaram formação de coágulo dentro de 30 minutos após adição do agente coagulante foram classificadas como N/C (leite não coagulado) (Bittante et al., 2013).

2.3.2 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica (AP) foi avaliada pelo conteúdo de nitrogênio não proteico (NPN) liberado da precipitação de proteínas por adição de ácido tricloroacético 12% nos coágulos obtidos na seção 2.3.1 de acordo com a ISO/IDF (2016), por meio do método de *Kjeldahl*.

2.4 Rendimento potencial de fabricação de queijos e sinerese

O efeito do tipo de coagulante no rendimento potencial da fabricação de queijos foi avaliado em testes de coagulação em escala laboratorial de acordo com Remeuf et al. (1989) com modificações. Após a estabilização da temperatura a 32 °C, monitorada por termômetro de imersão total (HG, Brasil), 20 mL de leite reconstituído (seção 2.2) e 200 µL de cada agente coagulante (seção 2.1) foram adicionados em tubos (Ø 28,5 mm). Após a homogeneização, as amostras foram deixadas para coagulação em banho (VWR Ultrasonic Cleaner USC100T, Radnor Township, Pennsylvania, EUA) a 32 °C por 90 minutos e depois centrifugadas (3500×g, 15 min; HERMLE Z 323 K, HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Alemanha) sem corte prévio do coágulo. Após a centrifugação, o volume de soro de leite foi pesado, o coágulo foi liofilizado (Freeze Dryer Modulyo, Edwards, UK) e o rendimento da fabricação de queijos em base seca foi calculado pela determinação do peso antes e depois da liofilização e expresso em g 100 g⁻¹.

A sinerese foi calculada de acordo com Farnsworth et al. (2006) usando a Equação 1.

$$\text{sinerese (\%)} = \frac{\text{peso do soro}}{\text{peso do leite}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

2.5 Propriedades de coagulação do leite

As propriedades de coagulação do leite foram determinadas com o uso do Optigraph® (*Alliance Instruments*, França). 200 µL de cada agente coagulante (seção 2.1) diluídos 1:4 foram adicionados a 10 mL de leite reconstituído (seção 2.2) a 32 °C. A intensidade inicial do sinal

óptico foi ajustada para 7 Volts e todos os testes foram realizados em um período de 90 minutos, medindo os seguintes parâmetros: R (tempo de coagulação, medido em segundos); 0K20 (velocidade de agregação micelar, determinada como o tempo necessário para atingir uma firmeza padrão do coágulo, medida em segundos) e A₂₀, A₄₀, AR e A2R (medidas de firmeza após 20 ou 40 minutos do início do teste ou após duas ou três vezes R, respectivamente, medidas em volts) (Gomes et al., 2019).

Para as amostras que não coagularam dentro de 60 minutos após a adição do agente coagulante, as condições experimentais foram modificadas com o objetivo de estimular a formação do gel. Seguindo o procedimento descrito por Bittante et al. (2021), o intervalo de tempo foi estendido para até 180 minutos e, alternativamente, avaliou-se o efeito do aumento da concentração do agente coagulante. As amostras que durante a medição não atingiram a voltagem ajustada, necessária para que o equipamento calculasse automaticamente os parâmetros de coagulação, foram classificados como N/D (não disponível).

2.6 Caracterização dos coágulos

2.6.1 Caracterização espectroscópica

Os coágulos obtidos na seção 2.3.3 foram analisados por espectroscopia no infravermelho médio (MIR), utilizando um espectrômetro FTIR-ATR (Cary 630 FTIR, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EUA), equipado com acessório de reflectância total atenuada (ATR) com célula de cristal de diamante. 0,5 g de cada amostra foi colocada individualmente no compartimento ATR, em contato direto com o cristal de diamante. Os espectros foram adquiridos no modo absorbância, com resolução espectral de 4 cm⁻¹ e 64 varreduras, na faixa de número de onda de 4000 a 600 cm⁻¹. Antes de cada aquisição, foi realizada a leitura do espectro de fundo. Para cada amostra, foram realizadas duas repetições independentes, mantendo-se a temperatura ambiente em 25 °C. A aquisição e o processamento inicial dos espectros foram realizados utilizando o software Agilent MicroLab PC.

2.6.2 Grau de hidrólise da caseína

O nitrogênio solúvel em pH 4,6 dos coágulos obtidos em 2.3.3 foi extraído de acordo com o método descrito por Wolfschoon-Pombo & De Lima (1989). Inicialmente 5,0 g de coágulo foram adicionados de 40 mL de água ultra pura a 45 °C e 20 mL de solução de Citrato de Sódio 0,50 M (Sigma-Aldrich St. Louis, MO). A solução foi homogeneizada em dispersor

ULTRA-TURRAX (IKA T18, São Paulo, Brasil) a 11.000 rpm por 10 minutos e posteriormente filtrada em papel filtro Whatman n° 42. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com água ultra pura. Em seguida, 50 mL da solução foi transferida para um béquer de 100 mL e 5,0 mL de HCl 1,41 M (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) e 7,5 mL de água ultra pura foram adicionados. O pH da solução foi medido utilizando um medidor digital de pH (PHS3BW, Bel Equipamentos Analíticos Ltda., Piracicaba, SP, Brasil) e ajustado para 4,6 usando NaOH 0,5 M (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) e a solução filtrada com papel de filtro Whatman n° 42.

O grau de hidrólise da caseína foi expresso como nitrogênio solúvel em pH 4,6. O teor de nitrogênio solúvel a pH 4,6 foi determinado pelo método de *Kjeldahl*, utilizando um fator de 6,38 para converter o nitrogênio estimado em teor de proteína (Cai et al., 2024).

2.6.3 Caracterização cromatográfica

O perfil cromatográfico as amostras obtidas em 2.5.2 foi realizado por cromatografia líquida de fase reversa (CLAE-FR) de acordo com a metodologia de Ong et al. (2007) com modificações. O sistema HP Agilent 1260 Infinity II foi usado com uma coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 (250, 4,6 mm de diâmetro interno, 5 mm de tamanho de partícula). Foram usadas duas fases móveis, a primeira (A) composta de solução de acetonitrila 5% (v/v) (J.T.Baker®) e ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) (Merck, S.A.), e a segunda fase (B) formada por acetonitrila (J.T.Baker®) 50% (v/v) e ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) (Merck, S.A.).

Uma alíquota de 20 µL da amostra foi injetada na coluna em um fluxo de 1 mL/min como um gradiente das fases móveis A e B por 70 minutos. A análise começou com 100% de fluxo da fase móvel A e diminuiu linearmente por 60 minutos, até que 100% do fluxo fosse representado pela fase B e, de 60 a 65 minutos, um novo gradiente linear foi realizado para estabelecer o fluxo de 100% de A, que foi mantido até o final da análise. A detecção foi realizada a 215 nm em um detector UV-VIS. Para a avaliação dos cromatogramas foram considerados o tempo de retenção das frações, a área dos picos e seus espectros UV.

2.7 Desenho experimental e análises estatísticas

O estudo seguiu o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) em um esquema fatorial 5×3 , considerando cinco tipos de leite que apresentaram formação de coágulo nas condições experimentais (vaca, cabra, ovelha, búfala e camela) e três agentes coagulantes

(extrato de alcachofra, extrato de cardo e quimosina recombinante). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de três réplicas.

A ANOVA de duas vias foi aplicada para avaliar os principais efeitos (tipo de leite e agente coagulante) e suas interações. Quando foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$), as médias foram comparadas usando o teste *Tukey*. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa de *software* estatístico *Statistical Analysis System* (SAS), versão *Student 9.1* (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA, 2023).

3. Resultados e Discussão

3.1 Caracterização dos extratos vegetais

A atividade de coagulação do leite (ACL) e a atividade proteolítica (AP) foram determinadas para os extratos aquosos de alcachofra e cardo e para o quimosina recombinante (Tabela 1). A ACL variou significativamente entre os tipos de leite avaliados para todos os agentes coagulantes testados ($p < 0,05$), indicando que o desempenho dos coagulantes é influenciado pela composição do leite utilizado.

Para os extratos vegetais, observou-se maior eficiência de coagulação para leites de ovelha, cabra e búfala em comparação ao leite de vaca. Embora o mesmo padrão tenha sido observado para ambos extratos, os valores de ACL obtidos para extrato de cardo foram superiores aos observados para o extrato de alcachofra. Quando utilizada a quimosina recombinante, observaram-se valores de ACL superiores aos obtidos com os extratos vegetais para todos os tipos de leite, com maiores valores de ACL observados para o leite de cabra, seguido pelos leites de búfala e ovelha, sendo menos eficiente para o leite de vaca. Esses resultados indicam que, embora a eficiência da coagulação seja influenciada pela composição do leite para todos os agentes coagulantes avaliados, esse efeito foi mais evidente quando foram utilizados extratos vegetais.

A maior eficiência observada para o extrato de cardo em relação ao extrato de alcachofra pode estar relacionada à maior concentração relativa de enzimas com atividade coagulante, bem como a diferenças qualitativas no perfil de proteases entre as duas variedades de *Cynara cardunculus* L. (Liburdi et al., 2019; Manuelian et al., 2020; De Jesus et al., 2023). Por sua vez, a superioridade da quimosina recombinante para as diferentes amostras de leite avaliadas está associada à sua elevada especificidade pela ligação Phe₁₀₅–Met₁₀₆ da κ -caseína, resultando em clivagem mais eficiente da fração estabilizadora das micelas de caseína (Wang et al., 2021; McSweeney, 2022).

Tabela 1. Valores médios $\pm$ desvio padrão da atividade coagulante e proteolítica de extratos aquosos de alcachofra, cardo e quimosina recombinante.

Coagulante	Tipo de Leite	ACL (IMCU mL ⁻¹)	AP (g NPN 100 g ⁻¹ Nt)
Extrato de Alcachofra	Vaca	45 $\pm$ 0,03 ^{aA}	4,05 $\pm$ 1,9 ^{aA}
	Ovelha	184 $\pm$ 0,9 ^{bB}	4,99 $\pm$ 0,02 ^{aA}
	Cabra	99 $\pm$ 0,5 ^{cC}	4,28 $\pm$ 2,0 ^{aA}
	Búfala	88 $\pm$ 0,2 ^{dD}	4,89 $\pm$ 0,02 ^{aA}
	Égua	N/C	N/C
	Burra	N/C	N/C
	Camela	N/C	N/C
Extrato de Cardo	Vaca	105 $\pm$ 1,5 ^{Aa}	4,05 $\pm$ 1,9 ^{aA}
	Ovelha	248 $\pm$ 0,3 ^{bB}	3,74 $\pm$ 1,7 ^{aA}
	Cabra	214 $\pm$ 1,2 ^{cC}	5,70 $\pm$ 0,001 ^{bB}
	Búfala	192 $\pm$ 0,8 ^{dD}	4,89 $\pm$ 0,02 ^{aA}
	Égua	N/C	N/C
	Burra	N/C	N/C
	Camela	N/C	N/C
Quimosina Recombinante	Vaca	583 $\pm$ 0,8 ^{aA}	4,67 $\pm$ 0,01 ^{aA}
	Ovelha	1277 $\pm$ 0,7 ^{bB}	3,86 $\pm$ 0,02 ^{bB}
	Cabra	1455 $\pm$ 1,0 ^{cC}	5,70 $\pm$ 0,001 ^{cC}
	Búfala	1331 $\pm$ 0,6 ^{dD}	4,89 $\pm$ 0,02 ^{aA}
	Égua	N/C	N/C
	Burra	N/C	N/C
	Camela	N/C	N/C

a, b, c, d, A, B, C, D As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferiram entre si ($p > 0,05$) e as médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferiram entre si ($p > 0,05$). ACL: atividade de coagulação do leite; AP: atividade proteolítica; N/C: leite não coagulado (a coagulação não foi observada).

A AP não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) nas amostras coaguladas com o extrato de alcachofra, evidenciando que o tipo de leite não influenciou a atividade proteolítica desse agente coagulante. Em contraste, o uso do extrato de cardo promoveu maior liberação de nitrogênio não proteico no leite de cabra (5,70 g NPN 100 g⁻¹ Nt), indicando maior atividade proteolítica para esse tipo de leite. A quimosina recombinante exibiu maior variação entre os tipos de leite, com maior valor observado no leite de cabra. Esses resultados indicam que, apesar da elevada especificidade catalítica da quimosina, a extensão da proteólise primária não é

necessariamente menor em comparação aos extratos vegetais, variando conforme o tipo de leite avaliado.

As diferenças observadas entre os tipos de leite podem ser explicadas pelas variações na composição de proteínas do leite e na organização das micelas de caseína. Os leites de ovelha, cabra e búfala apresentam maior teor de proteína total e maior proporção de caseínas, além de micelas menos hidratadas e de menor tamanho médio, características que favorecem a agregação micelar após a clivagem da κ -caseína (Glantz et al., 2010; Fox et al., 2017). Em contraste, o leite de vaca apresenta micelas mais hidratadas e estruturalmente estáveis, o que pode explicar os menores valores de ACL observados sob as mesmas condições experimentais (Holt & Carver, 2024).

A extensão do intervalo de tempo para 180 minutos resultou na coagulação do leite de camela. No entanto, nem o prolongamento do tempo de observação nem o aumento da concentração do agente coagulante promoveram a coagulação dos leites de égua e burra, independentemente do agente coagulante utilizado, impossibilitando a determinação da atividade coagulante do leite (ACL) e da atividade proteolítica (AP).

No leite de camela, além do baixo teor relativo de κ -caseína (1,5–3,5%), diferenças estruturais nos sítios de clivagem dessa fração proteica em relação ao leite bovino podem reduzir a eficiência da ação dos coagulantes, dificultando a formação de um coágulo estável (Adil et al., 2022; Ho et al., 2022). Nos leites equinos, esse comportamento está associado à baixa concentração de caseínas (0,8% no leite de burra e 1,4% no leite de égua) e à elevada proporção de proteínas do soro, fatores que limitam a formação e a estabilização do coágulo (Papademas et al., 2023; Musaev et al., 2021).

3.2 Rendimento potencial de fabricação de queijos e sinérese

Observou-se que tanto o tipo de leite quanto o agente coagulante influenciaram significativamente o rendimento e a sinérese ($p < 0,05$) (Tabela 2), indicando que as condições de fabricação do queijo, particularmente o tipo de coagulante empregado, interagem com as características do leite (Liburdi et al., 2019).

O leite de ovelha apresentou os maiores valores de rendimento para os agentes coagulantes avaliados. Esse comportamento está associado aos elevados teores de gordura, proteína e caseína do leite de ovelha, que conferem maior retenção de sólidos na coalhada, confirmando resultados anteriores obtidos com metodologias semelhantes (Bittante et al., 2022).

Observou-se uma relação inversa entre sinerese e rendimento, de modo que valores mais elevados de sinerese estiveram associados a menor retenção de sólidos na coalhada. O leite de camela apresentou os menores rendimentos em base seca para todos os coagulantes avaliados, mesmo quando o tempo de coagulação foi duplicado. Esse resultado pode ser atribuído à alta proporção de proteínas do soro, que influenciam diretamente tanto as propriedades de coagulação do leite, quanto a eficiência na fabricação de queijos (Cipolat-Gotet et al., 2018; Amalfitano et al., 2019).

Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvio padrão do rendimento potencial de fabricação de queijos e sinerese.

Coagulante	Tipo de Leite	Rendimento (g 100 g ⁻¹)	sinerese (%)
Extrato de Alcachofra	Vaca	6,67 $\pm$ 0,2 ^{bB}	77,12 $\pm$ 0,2 ^{dD}
	Ovelha	7,43 $\pm$ 0,1 ^{aA}	82,75 $\pm$ 1,2 ^{cC}
	Cabra	6,03 $\pm$ 0,05 ^{cC}	81,47 $\pm$ 1,2 ^{cC}
	Búfala	5,75 $\pm$ 0,02 ^{cC}	84,18 $\pm$ 0,2 ^{bB}
	Égua	N/C	N/C
	Burra	N/C	N/C
	Camela	4,45 $\pm$ 0,01 ^{dD}	90,47 $\pm$ 0,8 ^{aA}
Extrato de Cardo	Vaca	6,58 $\pm$ 0,2 ^{bB}	77,58 $\pm$ 0,1 ^{dD}
	Ovelha	7,15 $\pm$ 0,4 ^{aA}	79,87 $\pm$ 0,3 ^{cC}
	Cabra	5,84 $\pm$ 0,02 ^{cC}	82,43 $\pm$ 0,5 ^{cC}
	Búfala	5,98 $\pm$ 0,3 ^{cC}	88,12 $\pm$ 0,6 ^{bB}
	Égua	N/C	N/C
	Burra	N/C	N/C
	Camela	4,62 $\pm$ 0,2 ^{dD}	90,80 $\pm$ 0,1 ^{aA}
Quimosina Recombinante	Vaca	6,29 $\pm$ 0,02 ^{bB}	78,19 $\pm$ 0,3 ^{dD}
	Ovelha	7,30 $\pm$ 0,1 ^{aA}	82,34 $\pm$ 0,5 ^{cC}
	Cabra	5,94 $\pm$ 0,2 ^{cC}	81,58 $\pm$ 0,5 ^{cC}
	Búfala	6,18 $\pm$ 0,2 ^{cC}	83,18 $\pm$ 1,2 ^{bB}
	Égua	N/C	N/C
	Burra	N/C	N/C
	Camela	3,90 $\pm$ 0,1 ^{dB}	91,87 $\pm$ 0,2 ^{aA}

a, b, c, d, A, B, C, D As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferiram entre si ($p > 0,05$) e as médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferiram entre si ($p > 0,05$). Rendimento: expresso em g de coágulo seco por 100 g de leite; N/C: leite não coagulado (a coagulação não foi observada).

Segundo Mariani et al. (2022), o rendimento é um parâmetro fundamental para determinar a rentabilidade das indústrias de laticínios e dos produtores rurais, uma vez que maior rendimento em base seca indica maior aproveitamento de sólidos totais e menor volume de leite necessário para a produção de queijo.

Em relação aos coagulantes, não foram observadas diferenças no rendimento e sinerese entre os extratos de alcachofra e cardo para nenhum dos tipos de leite avaliados, indicando que, do ponto de vista tecnológico, ambos os extratos apresentam desempenho equivalente. Em contraste, a utilização da quimosina recombinante induziu maior porcentagem de sinerese para o leite de vaca. Esses resultados indicam que os extratos do gênero *Cynara* apresentam comportamento comparável ao da quimosina recombinante quanto à retenção de sólidos e à liberação de soro nos leites de ovelha, cabra, búfala e camela, enquanto no leite de vaca a maior especificidade catalítica da quimosina pela κ -caseína está associada a maior contração do gel e maior expulsão de soro (Wang et al., 2021).

3.3 Propriedades de coagulação do leite

As propriedades de coagulação do leite estão apresentadas na Tabela 3. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os agentes coagulantes e os tipos de leite para os parâmetros de tempo de coagulação (R), velocidade de agregação micelar (0K20) e firmeza da coalhada ao longo do tempo (A_{20} , A_{40} , AR e A2R).

O leite de búfala apresentou tempos de coagulação mais curtos (menores valores de R) e maior firmeza, evidenciado pelos maiores valores de A_{40} , independentemente do agente coagulante utilizado. Esse comportamento está associado ao elevado teor de sólidos totais e gordura e a alta relação caseína/proteína do leite de búfala, características que favorecem a formação e a estabilização da rede de caseínas durante a coagulação (Bittante et al., 2021; Arora et al., 2022).

No entanto, o leite de ovelha apresentou tempos de coagulação prolongados (maiores valores de R) para os extratos vegetais e menor firmeza quando comparado aos leites de vaca, cabra e búfala. Resultados semelhantes foram encontrados por Alves et al. (2004), que observaram maior lentidão na coagulação do leite ovino quando coagulantes vegetais foram utilizados. Segundo Gomes et al. (2024), essa diferença pode ser atribuída à menor especificidade catalítica dos extratos de cardo, resultando em diferenças na organização da rede de caseínas formadas durante a coagulação e com impacto direto na firmeza final da coalhada.

Tabela 3. Valores médios $\pm$ desvio padrão das propriedades de coagulação dos diferentes leites, usando coagulantes de alcachofra, cardo e quimosina recombinante.

Coagulante	Tipo de Leite	Propriedades tecnológicas					
		R (s)	AR (V)	A2R (V)	A ₂₀ (V)	A ₄₀ (V)	0K20 (s)
Extrato de Alcachofra	Vaca	1001 $\pm$ 1,8 ^{aA}	13,92 $\pm$ 0,1 ^{aA}	14,09 $\pm$ 0,1 ^{aA}	5,71 $\pm$ 0,02 ^{aA}	5,71 $\pm$ 0,02 ^{aA}	235 $\pm$ 0,4 ^{aA}
	Ovelha	1751 $\pm$ 0,6 ^{bA}	11,84 $\pm$ 0,7 ^{bA}	11,87 $\pm$ 0,6 ^{bA}	2,34 $\pm$ 0,7 ^{bA}	11,83 $\pm$ 0,7 ^{bA}	339 $\pm$ 0,5 ^{bA}
	Cabra	1153 $\pm$ 1,8 ^{cA}	11,38 $\pm$ 0,2 ^{bA}	11,52 $\pm$ 0,2 ^{bA}	1,49 $\pm$ 0,05 ^{cA}	11,41 $\pm$ 0,2 ^{cA}	223 $\pm$ 0,2 ^{cA}
	Búfala	787 $\pm$ 0,6 ^{dA}	13,85 $\pm$ 0,6 ^{aA}	17,98 $\pm$ 0,01 ^{cA}	7,54 $\pm$ 0,6 ^{dA}	18,13 $\pm$ 0,6 ^{dA}	298 $\pm$ 0,6 ^{dA}
	Égua	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	Burra	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	Camela	701 $\pm$ 0,07 ^{eA}	4,12 $\pm$ 0,4 ^{cA}	1,77 $\pm$ 0,4 ^{dA}	2,99 $\pm$ 0,4 ^{eA}	1,37 $\pm$ 0,4 ^{eA}	389 $\pm$ 0,9 ^{eA}
Extrato de Cardo	Vaca	1154 $\pm$ 1,4 ^{aB}	10,33 $\pm$ 0,2 ^{aB}	11,14 $\pm$ 0,2 ^{aB}	1,35 $\pm$ 0,02 ^{aB}	10,41 $\pm$ 0,2 ^{aB}	232 $\pm$ 2,3 ^{aB}
	Ovelha	1751 $\pm$ 0,6 ^{bA}	11,94 $\pm$ 0,01 ^{bA}	11,91 $\pm$ 0,03 ^{aA}	2,11 $\pm$ 0,5 ^{bA}	11,94 $\pm$ 0,5 ^{bA}	320 $\pm$ 0,2 ^{bB}
	Cabra	1154 $\pm$ 1,5 ^{aA}	11,13 $\pm$ 0,6 ^{bA}	11,67 $\pm$ 0,01 ^{aA}	1,43 $\pm$ 0,6 ^{aA}	11,21 $\pm$ 0,6 ^{cA}	226 $\pm$ 0,3 ^{cB}
	Búfala	777 $\pm$ 0,6 ^{cB}	15,52 $\pm$ 0,2 ^{cB}	18,87 $\pm$ 0,4 ^{bB}	7,70 $\pm$ 1,3 ^{cA}	19,03 $\pm$ 0,4 ^{dB}	279 $\pm$ 2,3 ^{dB}
	Égua	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	Burra	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	Camela	701 $\pm$ 1,3 ^{dA}	4,02 $\pm$ 0,02 ^{dA}	1,78 $\pm$ 0,1 ^{cA}	2,92 $\pm$ 0,07 ^{dA}	1,46 $\pm$ 0,03 ^{bA}	406 $\pm$ 1,9 ^{eB}
Quimosina Recombinante	Vaca	1155 $\pm$ 1,5 ^{aB}	11,70 $\pm$ 0,3 ^{aC}	12,69 $\pm$ 0,4 ^{aC}	1,37 $\pm$ 0,04 ^{aB}	11,79 $\pm$ 0,3 ^{aC}	228 $\pm$ 3,2 ^{aB}
	Ovelha	751 $\pm$ 1,4 ^{bB}	12,86 $\pm$ 0,08 ^{bB}	12,81 $\pm$ 0,1 ^{aB}	7,70 $\pm$ 0,07 ^{bB}	12,81 $\pm$ 0,1 ^{bB}	309 $\pm$ 0,5 ^{bC}
	Cabra	1253 $\pm$ 2,9 ^{cB}	12,77 $\pm$ 0,9 ^{bB}	13,22 $\pm$ 1,2 ^{bB}	1,55 $\pm$ 0,09 ^{aA}	13,16 $\pm$ 1,4 ^{cB}	261 $\pm$ 1,4 ^{cC}
	Búfala	768 $\pm$ 1,4 ^{dC}	16,69 $\pm$ 0,01 ^{cC}	19,23 $\pm$ 0,1 ^{cC}	9,61 $\pm$ 0,5 ^{cB}	19,44 $\pm$ 0,1 ^{dB}	268 $\pm$ 0,2 ^{dC}
	Égua	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	Burra	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	Camela	725 $\pm$ 1,3 ^{eB}	8,51 $\pm$ 0,6 ^{dB}	4,33 $\pm$ 0,6 ^{dB}	6,20 $\pm$ 0,6 ^{dB}	2,08 $\pm$ 0,5 ^{eC}	370 $\pm$ 0,9 ^{eC}

a, b, c, d, A, B, C, D As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferiram entre si ($p > 0,05$) e as médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferiram entre si ($p > 0,05$). R: tempo de coagulação; AR, A2R, A₂₀ e A₄₀: firmeza da coalhada após duas e três vezes o tempo de coagulação (R) e aos 20 e 40 min, respectivamente, após a adição do coagulante, respectivamente; 0K20: velocidade de agregação micelar; s: segundos; V: volts. N/D: não disponível (a firmeza não foi atingida).

O leite de camela apresentou tempos de coagulação relativamente curtos para todos os coagulantes testados, associados, porém, à baixa firmeza do gel, refletido nos menores valores de A_{40} e nos maiores valores de OK_{20} . Esse padrão indica menor eficiência na agregação micelar, mesmo após a extensão do tempo de aquisição para 180 minutos, adotada para estimular a formação do gel. Hailu et al. (2016) indicam que a coagulação do leite de camela pode ser favorecida por ajustes nas condições tecnológicas, como aumento da temperatura, maior concentração de coagulante e redução do pH.

Os tempos de coagulação determinados pelo monitoramento do tempo de coagulação (R) não reproduziram o padrão observado para a atividade coagulante do leite (ACL). A ausência de correspondência entre esses parâmetros é particularmente evidente para o leite de ovelha, onde a eficiência de coagulação não se traduz necessariamente em menor tempo de formação do gel. Segundo Gomes et al. (2019), isso pode ser atribuído ao efeito dos parâmetros tecnológicos, como pH do leite e diluição do coagulante, ou diferenças no perfil dos coagulantes.

De modo geral, amostras com agregação micelar mais rápida (menores valores de OK_{20}) apresentaram maiores valores de firmeza da coalhada, conforme refletido nos parâmetros de firmeza determinados ao longo do tempo, em concordância com resultados previamente reportados na literatura (Gomes et al., 2019; Alvarenga et al., 2025). Entre os coagulantes, o uso do extrato de cardo apresentou maiores tempos de agregação micelar e menor firmeza, já o uso da quimosina recombinante promoveu coalhadas mais firmes nos diferentes tipos de leite, comportamento compatível com sua elevada especificidade pela ligação Phe₁₀₅–Met₁₀₆ da κ -caseína e com sua alta atividade específica de coagulação (Pazzola, 2019; McSweeney, 2022).

3.4 Caracterização dos Coágulos

A partir da espectroscopia MIR foram selecionados 13 espectros principais que apresentaram máxima absorção (Figura 1), associadas às vibrações de grupos funcionais característicos dos principais constituintes dos coágulos.

A absorção em 3321 cm^{-1} é atribuída ao estiramento de ligações N–H e O–H. As bandas em 2922 cm^{-1} e na região de 2850 cm^{-1} correspondem, respectivamente, ao estiramento assimétrico e simétrico do grupo metileno (C–H). As absorções localizadas na faixa de $1640\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ e $1550\text{--}1540\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas às vibrações da amida I (C=O) e da amida II (C–N e N–H), respectivamente. As bandas entre 1460 e 1400 cm^{-1} estão associadas a deformações angulares do grupo metileno, enquanto a região em torno de 1240 cm^{-1} corresponde às

vibrações da amida III (C–N). A absorção observada em 1080 cm^{-1} está relacionada a vibrações envolvendo ligações C–O (Cardoso et al., 2025; Onelli et al., 2025).

De modo geral, observaram-se perfis espectrais semelhantes entre os diferentes coagulantes, com variações na intensidade relativa das bandas, particularmente nas regiões associadas às amidas I e II, sem alterações das bandas. Considerando que as bandas de amida podem ser utilizadas para a avaliação estrutural da rede proteica formada durante a coagulação (Ye et al., 2017; Onelli et al., 2025), a ocorrência do mesmo conjunto de bandas em todos os espectros, sem o aparecimento de novas absorções, indica ausência de diferenças qualitativas detectáveis por FTIR-ATR na composição química dos coágulos.

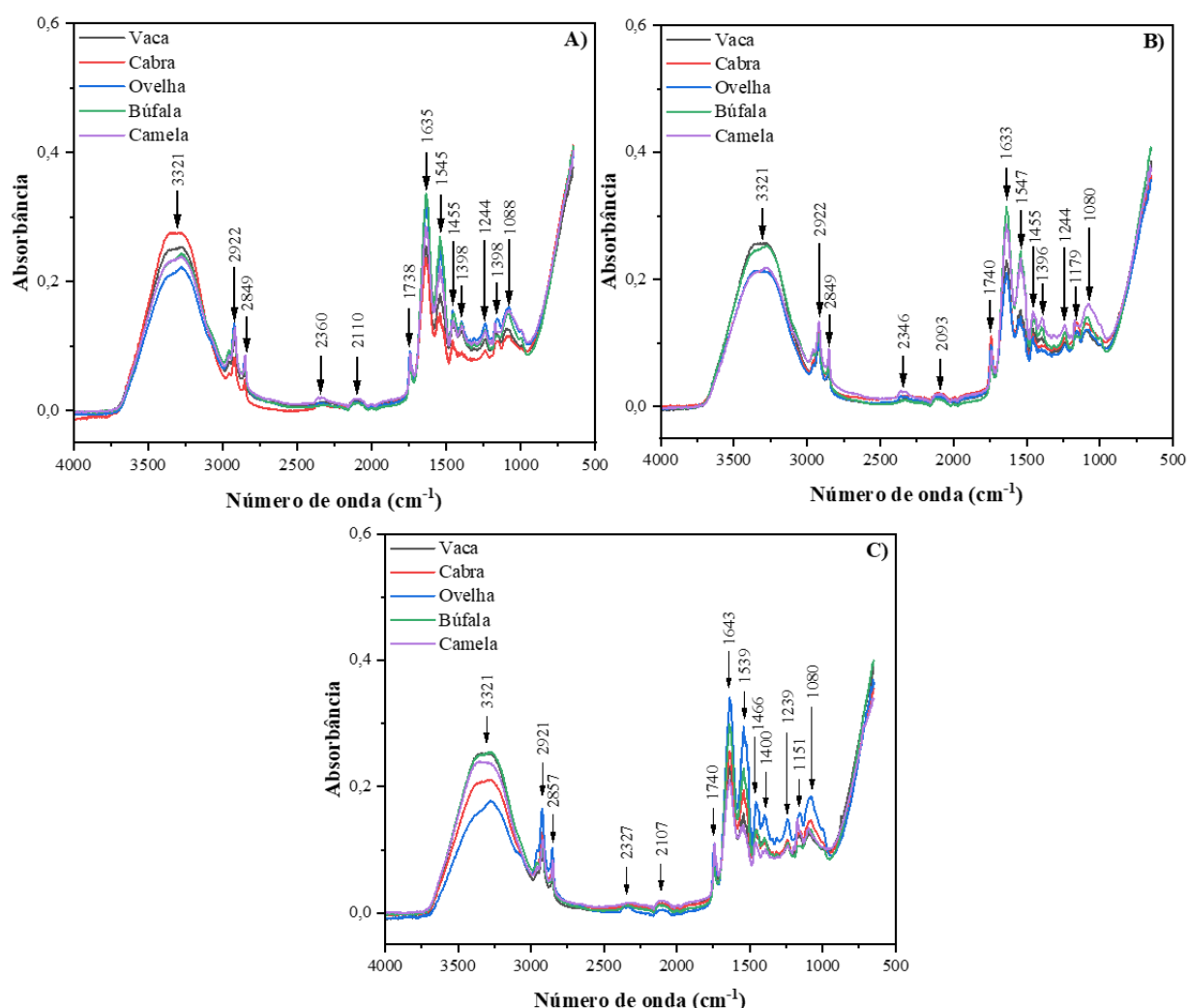


Figura 1. Espectros obtidos por MIR dos coágulos de leite de vaca, cabra, ovelha, búfala, égua, burra e camela, obtidos na faixa de 4000–600 cm^{-1} , após coagulação com extrato de alcachofra (A), extrato de cardo (B) e quimosina recombinante (C).

Para compreender o efeito dos diferentes coagulantes sobre a degradação da caseína, o grau de hidrólise da caseína, expresso como a fração proteica solúvel em pH 4,6 foi determinado para os leites que apresentaram coagulação (Figura 2). Os resultados evidenciaram efeito significativo do agente coagulante e do tipo de leite ($p < 0,05$), indicando que a ação do coagulante é modulada pelas características do leite. O coagulante é o principal responsável pela proteólise primária, ou seja, pela hidrólise inicial das caseínas e pela formação de peptídeos solúveis em pH 4,6 (McSweeney, 2022).

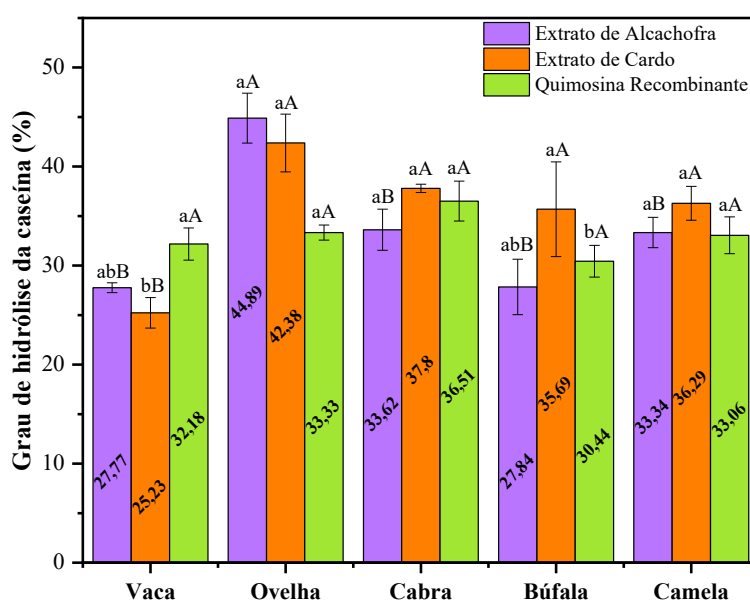


Figura 2. Grau de hidrólise da caseína, expresso como a fração proteica solúvel em pH 4,6 em relação à proteína total. a, b, A, B Médias seguidas pela mesma letra minúscula (tipo de leite) e pela mesma letra maiúscula (coagulante) não diferem entre si ($p > 0,05$).

A quimosina recombinante promoveu maior grau de hidrólise da caseína do leite bovino (32,18%) quando comparada ao extrato de cardo (25,23%) ($p < 0,05$). Esse comportamento é consistente com a maior especificidade catalítica da quimosina, que favorece a formação da fração proteica solúvel em pH 4,6 no leite bovino (Fox et al., 2017; McSweeney, 2022).

Para os extratos vegetais, não foram observadas diferenças significativas nos leites de ovelha e cabra ($p > 0,05$), com graus de hidrólise da caseína variando de 33,62% a 44,89%. Esse resultado indica que, a extensão da proteólise primária foi semelhante independentemente do perfil enzimático do coagulante, o que pode ser atribuído ao maior teor de caseína para a ação proteolítica do coagulante retido na coalhada (Fox et al., 2017; Nuñez, 2022).

O extrato de cardo apresentou maior grau de hidrólise nos leites de búfala (35,69%) e camela (36,29%) quando comparado à quimosina recombinante (30,44% e 33,06%,

respectivamente). Esse resultado é compatível com a maior proporção de enzimas com atividade semelhante à pepsina no extrato de cardo, caracterizadas por menor especificidade e maior capacidade de hidrolisar frações como a α_s -caseína, resultando em maior acúmulo de proteína solúvel em pH 4,6 (Uniacke-Lowe & Fox, 2017; Nuñez, 2022).

Para confirmar a hidrólise das proteínas dos coágulos, o perfil do nitrogênio solúvel em pH 4,6 foi obtido por CLAE-FR (Figura 3).

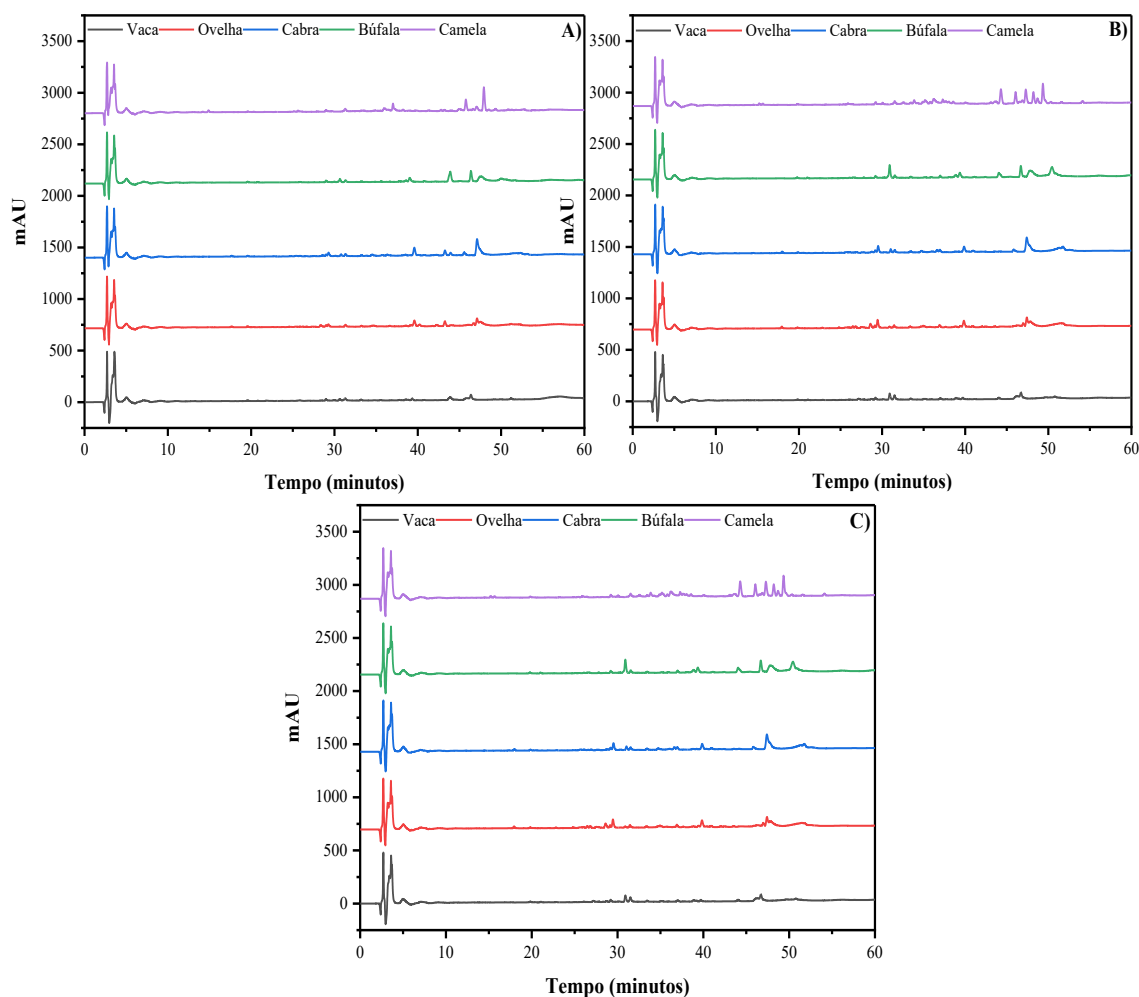


Figura 3. Perfis cromatográficos por CLAE-FR do nitrogênio solúvel em pH 4,6 dos coágulos obtidos com extrato de alcachofra (A), extrato de cardo (B) e quimosina recombinante (C).

De modo geral, os cromatogramas revelaram diferenças no número, intensidade e distribuição dos picos ao longo do tempo, indicando diferenças na extensão e no padrão da proteólise primária das caseínas promovida pelos coagulantes avaliados. Em todas as amostras o nitrogênio eluiu entre aproximadamente 30 e 50 min, região associada à presença de peptídeos de média a alta massa molecular, predominantemente derivados de α_{s1} -, α_{s2} - e β -caseínas. Esse padrão é característico da proteólise primária induzida pelo coagulante residual retido na coalhada e tem sido amplamente descrito para sistemas de coagulação enzimática do leite, nos

quais a hidrólise inicial da κ -caseína é acompanhada por clivagens secundárias (McSweeney, 2022; Boran et al., 2023).

Os perfis obtidos com extrato de cardo e quimosina recombinante (Fig. 3B e C) foram semelhantes entre si, apresentando maior número de picos e maior intensidade. No extrato de cardo, a presença de cardosinas com atividade do tipo pepsina favorece clivagens adicionais, resultando em um espectro mais amplo de peptídeos solúveis. Em contraste, a quimosina recombinante, altamente específica pela ligação Phe₁₀₅–Met₁₀₆ da κ -caseína, origina um perfil cromatográfico com menor diversidade de picos, compatível com uma proteólise primária mais controlada (Uniacke-Lowe & Fox, 2017; McSweeney, 2022).

De forma consistente entre os tipos de leite, as amostras coaguladas com o extrato de alcachofra (Fig. 3A) apresentaram picos de menor intensidade no perfil nitrogênio solúvel. Esse perfil é compatível com a presença de proteases aspárticas com atividade proteolítica mais controlada e é considerado tecnologicamente favorável para a produção de queijos com proteólise moderada (Colombo et al., 2020; De Jesus et al., 2023; Onelli et al., 2025).

Além do efeito do coagulante, o tipo de leite influenciou os perfis cromatográficos. Para o extrato de alcachofra, o leite de camela apresentou menor número de picos na região próxima a 50 min, indicando proteólise menos intensa. Esse resultado reflete as características do leite de camela, como menor proporção de κ -caseína e micelas de maior diâmetro e menor mineralização, que condicionam a ação inicial do coagulante e a resposta proteolítica subsequente (Roy et al., 2020; McSweeney, 2022).

Embora a maior parte do coagulante seja removida com o soro, a fração retida no coágulo desempenha papel determinante na hidrólise inicial das caseínas (McSweeney, 2022). Em conjunto, os resultados demonstram que o coagulante define o padrão inicial da hidrólise, enquanto o tipo de leite modula sua extensão, evidenciando que o desempenho proteolítico de coagulantes vegetais do gênero *Cynara* é dependente da matriz láctea.

4. Conclusão

Os resultados demonstraram que o desempenho de coagulantes vegetais do gênero *Cynara* foi dependente do tipo de leite, refletindo diferenças na composição proteica, na organização das micelas de caseína e na dinâmica de agregação micelar. Os extratos aquosos de flores de alcachofra e cardo apresentaram maior eficiência de coagulação e melhor aptidão tecnológica nos leites de ovelha, cabra e búfala, enquanto o leite bovino exibiu desempenho inferior sob as mesmas condições experimentais. Leite de égua e burra não coagularam nas

condições avaliadas, e o leite de camela, mesmo após extensão do tempo, apresentou baixa firmeza, rendimento reduzido e elevada sinerese.

A caracterização espectroscópica revelou semelhanças no perfil dos coágulos para os diferentes agentes coagulantes, enquanto a fração proteica solúvel em pH 4,6 e os perfis cromatográficos indicaram que o tipo de coagulante determinou a extensão e o padrão da proteólise primária, modulados pela matriz láctea. Os resultados indicaram que a escolha do coagulante deve considerar o tipo de leite e o perfil tecnológico desejado, sustentando o uso de coagulantes vegetais do gênero *Cynara* como alternativas tecnicamente viáveis à quimosina em leites não bovinos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a ENS International B.V. e Asinus Atlanticus S.A. pelo gentil fornecimento das amostras de leite em pó de cabra, ovelha e burra, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Alimentos (PPGECAL) e à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB).

5. Referências

- Adil, S., Mehta, B. M., Jana, A. H. (2022). Chemistry, Nutritional Properties and Application of Mare's Milk: A Review. *Agricultural Reviews*, 43, 355-361. <https://doi.org/10.18805/ag.R-2232>
- Alvarenga, N., Fernandes, J., Gomes, S., Baltazar, T., Fiates, V., Fidalgo, L. G., Santos, T., Conceição, C., Dias, J. (2025). Impact of different *Cynara cardunculus* L. extracts on the physicochemical, microbial, and sensory properties of Serpa cheese. *International Dairy Journal*, 162, 106159. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.106159>
- Alves, S.M.P., Martins, A.P.L., Mourato, M.P., Vasconcelos, M.M., Fontes, A.M.L. (2004). Effect of Clotting Agent on Coagulation Properties of Sheep Milk. In: *Proceedings of the International Symposium: The Future of the Sheep and Goat Dairy Sectors*, Zaragoza, Spain, 28-30.
- Amalfitano, N., C. Cipolat-Gotet, A. Cecchinato, M. Malacarne, A. Summer, G. Bittante. (2019). Milk protein fractions strongly affect the patterns of coagulation, curd firming, and syneresis. *Journal of Dairy Science*, 102, 2903-2917. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15524>
- Arora, S., Sindhu, J. S., Khetra, Y. (2022). Buffalo Milk. In: *McSweeney, P. L. H.; Mcnamara, J. P. Encyclopedia of dairy sciences*. 3^a ed. London, UK: Elsevier, p. 785-796. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00316-2>
- Bathmanathan, R., Yahya, Y. A. C., Yusoff, M. M., & Vejayan, J. (2019). Utilizing coagulant plants in the development of functional dairy foods and beverages: A mini review. *Journal of Biological Sciences*, 19, 259-271. <https://doi.org/10.3923/jbs.2019.259.271>
- Bittante, G., Amalfitano, N., Bergamaschi, M., Patel, N., Haddi, M., Benabid, H., Pazzola, M.,

- Vacca, G. M., Tagliapietra, F., Schiavon, S. (2022). Composition and aptitude for cheese-making of milk from cows, buffaloes, goats, sheep, dromedary camels, and donkeys. *Journal of Dairy Science*, 105, 2132-2152. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20961>
- Bittante, G., Penasa, M., Cecchinato, A. (2013). Genetic and environmental factors affecting milk coagulation properties of Italian Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 96, 215-230. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5592>
- Boran, O. S., Sulejmani, E., Hayaloglu, A. A. (2023). Acceleration of proteolysis, flavour development and enhanced bioactivity in a model cheese using Küflü cheese slurry: An optimisation study. *Food Chemistry*, 412, 135495. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135495>
- Cai, H., Luo, H., Scholten, E., Sala, G., Bijl, E. (2024). Impact of chymosin/pepsin ratio on casein hydrolysis, gelation behavior and texture of model cheese. *Food Hydrocolloids*, 156, 110257. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110257>
- Cardoso, K. L. R., De Jesus, J. C., Dargère, A. F., Da Capela, A. P., Oliveira, T. F., Carvalho, G. R., Santos, L. S., Faria, P. B., Ferrão, S. P. B. (2025). Discrimination of artisanal Minas cheeses according to geographical origin using spectroscopic and chromatographic techniques associated with chemometrics. *Food Chemistry*, 484, 144466. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144466>
- Cipolat-Gotet, C., A. Cecchinato, M. Malacarne, G. Bittante, A. Summer. (2018). Variations in milk protein fractions affect the efficiency of the cheese-making process. *Journal of Dairy Science*, 101, 8788-8804. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14503>
- Colombo, M. L., Cimino, C. V., Bruno, M. A., Hugo, A., Liggieri, C., Fernández, A., Vairo-Cavalli, S. (2020). Artichoke cv. Francés flower extract as a rennet substitute: effect on textural, microstructural, microbiological, antioxidant properties, and sensory acceptance of miniature cheeses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100, 5302-5312. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10749>
- Conceição, D.G., Reis, L. C. C., Virgens, E.S., De Jesus, J. C., Bauer, L.C., Chaves, M.A., Bonomo, R.C.F., Santos, L.S.S., Ferrão, S. P. B. (2024). Thermal, structural and spectroscopic properties of powder sheep milk obtained by different drying methods. *International Dairy Journal*, 150, 105845. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105845>
- Crosetti, V., Sola, A., Grigioni, G., Torres, M. J. (2023). Milk-clotting properties and primary proteolysis of a lyophilised extract from artichoke flowers (*Cynara scolymus* L.). *Food Technology and Biotechnology*, 61, 402-409. <https://doi.org/10.17113/ftb.61.03.23.8142>
- De Jesus, J. C., Reis, L. C. C., Santos, M. P. F., Santos, L. S., Ferrão, S. P. B. (2023). Chemical characterization of aspartic protease from artichoke flower (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*) using MIR spectroscopy and analytical measurements. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 34, 1520-1530. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20230065>
- De Jesus, J. C., Tolentino, I. C. S. A., Reis, L. C. C., Conceição, D. G., Onelli, R. R. V., Santos, L. S., Ferrão, S. P. B. (2024). Biofunctional, chemical and sensory profile of mature cheese produced with artichoke flower coagulant (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*). *International Dairy Journal*, 156, 105976. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.105976>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2025). Gateway to dairy production and products. Accessed jun. 01, 2025. <http://www.fao.org/dairy-production-products/productiondairy-animals/en/>.
- Farnsworth, J.P., Li, J., Hendricks, G. M., Guo, M.R. (2006). Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. *Small Ruminant Research*, 65, 113-121. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.05.036>
- Fox, P. F., Cogan, T. M., Guinee, T. P. (2017). Factors That Affect the Quality of Cheese. In: Mcsweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cotter, P. D., Everett, D. W. *Cheese Chemistry, Physics*

- & *Microbiology*. 4th ed. London, UK: Elsevier, p. 617-641. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00025-9>
- Fresno, M., Argüello, A., Torres, A., Castro, N., Álvarez, S., Sepe, L. (2023). Invited review. Milk clotting enzymes: A transcendental decision in goat's milk cheese quality. *Small Ruminant Research*, 229, 107147. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2023.107147>
- Ghribi, A. M., Gafsi, I. M., Blecker, C., Attia, H., Bouaziz, M. A., & Besbes, S. (2022). *Cynara cardunculus* as a potential source of milk coagulating protease: Effects on physical properties of cow's milk. *Food Science & Nutrition*, 10, 3855-3864. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2981>
- Glantz, M., Devold, T. G., Vegarud, G. E., Månsson, H. L., Stålhammar, H., Paulsson, M. (2010). Importance of casein micelle size and milk composition for milk gelation. *Journal of Dairy Science*, 93, 1444-1451. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2856>
- Gomes, S., Belo, A.T., Alvarenga, N., Dias, J., Lage, P., Pinheiro, C., Pinto-Cruz, C., Brás, T., Duarte, M. F., Martins, A. P. L. (2019). Characterization of *Cynara cardunculus* L. flower from Alentejo as a coagulant agent for cheesemaking. *International Dairy Journal*, 91, 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.09.010>
- Gomes, S., Pina, I., Fernandes, J., Dias, J., Reboredo, F., Martins, A. P. L., Alvarenga, N. (2024). Comparative Study of Coagulation Dynamics: Cardoon Flower Extract vs. Chymosin. *Dairy*, 5, 817-827. <https://doi.org/10.3390/dairy5040059>
- Gostin, A. I., Waisundara, V. Y. (2019). Edible flowers as functional food: A review on artichoke (*Cynara cardunculus* L.). *Trends Food Science and Technology*, 86, 381-391. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.015>
- Hailu, Y., Hansen, E. B., Seifu, E., Eshetu, M., Ipsen, R. (2016). Factors influencing the gelation and rennetability of camel milk using camel chymosin. *International Dairy Journal*, 60, 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.01.013>
- Ho, T. M., Zou, Z., Bansal, N. (2022). Camel milk: A review of its nutritional value, heat stability, and potential food products. *Food Research International*, 153, 110870. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110870>
- Holt, C., Carver, J. A. (2024). Invited review: Modeling milk stability. *Journal of Dairy Science*, 107, 5259-5279. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-24779>
- ISO/IDF. (2006). Milk and milk products e ovine and caprine rennets e determination of total milk-clotting activity. ISO 23058 | IDF 199. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- ISO/IDF. (2016). Milk and milk products - Determination of nitrogen content - Part 4: Determination of non-protein nitrogen content and true protein content calculation (Reference method). ISO 8968-4 | IDF 20-4. Geneva, Switzerland: International organization for standardization. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- Kayihura, J. F. (2024). Extent of κ -casein hydrolysis during renneting of bovine milk: A critical assessment of the analytical and estimation approaches. *Food Science & Nutrition*, 12, 1399-1412. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3868>
- Li, Y., Zhong, Y., Xing, F., Huang, A., Wang, X. (2024). Comparative analysis of the quality of buffalo milk fresh cheese processed with *Moringa oleifera* seed milk coagulant and calf rennet. *Journal of Dairy Science*, 107, 10571-10583. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25451>
- Liburdi, K., Boselli, C., Giangolini, G., Amatiste, S., Esti, M. (2019). An evaluation of the clotting properties of three plant rennets in the milks of different animal species. *Foods*, 8, 600. <https://doi.org/10.3390/foods8120600>
- Manuelian, C. L., Boselli, C., Vigolo, V., Giangolini, G., De Marchi, M. (2020). Effects of animal versus vegetal rennet on milk coagulation traits in Mediterranean buffalo bulk milk. *Journal of Dairy Science*, 103, 4958-4964. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17208>

- Mariani, E., Malacarne, M., Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., Bittante, G., Summer, A. (2022). Prediction of fresh and ripened cheese yield using detailed milk composition and udder health indicators from individual Brown Swiss cows. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 1012251. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1012251>
- McSweeney, P. Rennets and Coagulants. In: McSweeney, P. L. H.; Mcnamara, J. P. *Encyclopedia of dairy sciences*. 3^a ed. London, UK: Elsevier, 2022. p. 316-320. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00268-3>
- Mozzon, M., Foligni, R., Mannozzi, C., Zamporlini, F., Raffaelli, N., Aquilanti, L. (2020). Clotting properties of *Onopordum tauricum* (Willd.) aqueous extract in milk of different species. *Foods*, 9, 692-707. <https://doi.org/10.3390/foods9050692>
- Musaev, A., Sadykova, S., Anambayeva, A., Saizhanova, M., Balkanay, G., Kolbaev, M. (2021). Mare's Milk: Composition, Properties, and Application in Medicine. *Archives of Razi Institute*, 76, 1125-1135. <https://doi.org/10.22092/ari.2021.355834.1725>
- Núñez, M. (2022). Enzymes Exogenous to Milk in Dairy Technology: Proteinases. In: McSweeney, P. L. H.; McNamara, J. P. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 3rd ed. London, UK: Elsevier, p. 648-655. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00298-1>
- Onelli, R. R. V., De Jesus, J. C., Lins, R. P., Da Capela, A. P., Soares, L. S., Ferrão, S. P. B. (2026). Technological innovation in the production of matured buffalo cheese using artichoke flower extract (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) as a coagulant: organic acid profile, proteomic and sensory study. *International Dairy Journal*, 173, 106491. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2025.106491>
- Onelli, R. R. V., De Jesus, J. C., Lins, R. P., Da Capela, A. P., Soares, L. S., Ferrão, S. P. B. (2025). Application of spectroscopic and chromatographic techniques to assess proteolysis in cheeses produced with vegetable coagulants. *Food Chemistry*, 430, 137089. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.137089>
- Ong, L., Henriksson, A., Shah, N.P. (2007). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. *Lait*, 87, 149-165. <https://doi.org/10.1051/lait:2007004>
- Papademas, P., Neokleous, I., Mousikos, P. (2023). Thermal processing of equine milk e A review. *International Dairy Journal*, 138, 105541. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105541>
- Pazzola, M. (2019). Coagulation Traits of Sheep and Goat Milk. *Animals*, 9, 540. <https://doi.org/10.3390/ani9080540>
- Rampanti, G., Raffo, A., Melini, V., Moneta, E., Nardo, N., Saggia Civitelli, E., Bande-De Leon, C., Tejada Portero, L., Ferrocino, I., Franciosa, I., Cardinali, F., Osimani, A., Aquilanti, L. (2023). Chemical, microbiological, textural, and sensory characteristics of pilot-scale Caciofiore cheese curdled with commercial *Cynara cardunculus* rennet and crude extracts from spontaneous and cultivated *Onopordum tauricum*. *Food Research International*, 173, 113459. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113459>
- Remeuf, F., Lenoir, J., Duby, C. (1989). Étude des relations entre les caractéristiques physico-chimiques des laits de chèvre et leur aptitude à la coagulation par la présure. *Le Lait*, 69, 499-518. <https://doi.org/10.1051/lait:1989634>
- Roy, D., Ye, A., Moughan, P. J., Singh, H. (2020). Composition, Structure, and Digestive Dynamics of Milk From Different Species—A Review. *Frontiers in Nutrition*, 7, 577759. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.577759>
- Statistical Analysis System. (2023). Statistical analysis system (SAS), student version. USA: SAS Institute Inc.
- Uniacke-Lowe, T., Fox, P. F. (2017). Chymosin, Pepsins and Other Aspartyl Proteinases: Structures, Functions, Catalytic Mechanism and Milk-Clotting Properties. In: McSweeney, P. L. H.; Fox, P. F.; Cotter, P. D.; Everett, D. W. *Cheese Chemistry, Physics*

- & *Microbiology*. 4th ed. London, UK: Elsevier, p. 69-112. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00004-1>
- Wang, S., Zhang, P., Xue, Y., Yan, Q., Li, X., Jiang, Z. (2021). Characterization of a Novel Aspartic Protease from *Rhizomucor miehei* Expressed in *Aspergillus niger* and Its Application in Production of ACE-Inhibitory Peptides. *Foods*, 10, 29-49. <https://doi.org/10.3390/foods10122949>
- Wolfschoon-Pombo, A. L., Lima, A. (1989). Extent and depth of proteolysis in Minas Frescal cheese. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 44, 50-54.
- Ye, M. P., Zhou, R., Shi, Y. R., Chen, H. C., Du, Y. (2017). Effects of Heating on the Secondary Structure of Proteins in Milk Powders Using Mid-Infrared Spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 100, 89–95. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11443>

CAPÍTULO IV: Impactos tecnológicos de coagulantes vegetais comerciais e extrato da flor de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) no perfil físico-químico e proteômico de queijos frescos

Impactos tecnológicos de coagulantes vegetais comerciais e extrato da flor de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) no perfil físico-químico e proteômico de queijos frescos

Arthur P. da Capela^a, Cleidiane P. da S. dos Santos^a, Renata de S. da Rocha^a, Cristina M. dos S. Conceição^b, Sibelli P. B. Ferrão^a

^a *Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, Brasil*

^b *Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development & CHANGE – Global Change and Sustainability Institute, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Évora, Portugal*

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

Resumo

Objetivou-se caracterizar o perfil enzimático, estrutural e tecnológico de coagulantes vegetais comerciais à base de cardo (*Cynara cardunculus* L.) e do extrato da flor de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*), bem como avaliar seus efeitos nas propriedades físico-químicas, texturais e espectroscópicas do queijo fresco. Foram avaliados 10 coagulantes vegetais comerciais (A, B, C, D, E, F, G, J, L e Z) e o extrato da flor de alcachofra, utilizando-se como referência coalhos animais (1, 2 e 3) e coagulante microbiano. As amostras foram caracterizadas quanto ao teor de proteína, atividade proteolítica (AP), atividade de coagulação do leite (ACL), razão de especificidade (RE) e propriedades físicas da coalhada (LA e CRA), perfil espectroscópico (MIR) e cromatográfico. Com base na razão de especificidade, foram selecionados o coagulante vegetal Z (CVZ) e o extrato da flor de alcachofra (EA) para a produção de queijo fresco, utilizando-se o coagulante microbiano como referência. Os queijos foram avaliados quanto aos parâmetros físico-químicos, textura, rendimento e perfis espectroscópicos no infravermelho próximo (NIR) e médio (MIR). Os resultados indicaram elevada concentração proteica no extrato da flor de alcachofra (16,97 mg mL⁻¹), alta ACL nas amostras B, J, L e Z (352–380 IMCU mL⁻¹), maior AP na amostra L (25,93 µg mg⁻¹), maior razão de especificidade para o coagulante microbiano (26,58), além de maior CRA, associada a menor LA, para E, F e Z e para o extrato da flor de alcachofra. Diferenças no perfil enzimático foram confirmadas por espectroscopia no infravermelho médio e cromatografia de exclusão por tamanho. Os queijos produzidos com EA e CVZ apresentaram maior acidez titulável e umidade, menores teores de gordura e proteína, menor dureza e adesividade e menor luminosidade. Os espectros NIR e MIR apresentaram padrões espectrais semelhantes entre os queijos, com diferenças restritas à intensidade das bandas, associadas à composição. Esses resultados evidenciam que, nas condições avaliadas, o extrato da flor de alcachofra e o coagulante vegetal Z apresentaram desempenho tecnológico comparável ao coagulante microbiano, confirmando sua viabilidade como agentes coagulantes alternativos para a produção de queijo fresco.

Palavras-chave: perfil enzimático, coagulantes vegetais, atividade de coagulação do leite, queijo fresco.

1. Introdução

O queijo é um dos produtos lácteos mais amplamente consumidos em todo o mundo, representando aproximadamente 35 – 40 % de todo o leite processado e abrangendo de 3000 diferentes variedades produzidas sob diversas condições tecnológicas (Santiago-López et al., 2018). Apesar dessa diversidade, a etapa mais fundamental na fabricação de todas as variedades de queijo é a coagulação, causada pela hidrólise enzimática sobre a ligação Phe₁₀₅–Met₁₀₆ da κ -caseína (Fox & Guinee, 2022). Nesse sentido, os coagulantes desempenham um papel central na definição das características da coalhada e do produto final (Gomes et al., 2024).

Na fabricação industrial de queijo, o uso de proteases gástricas como coalho (de bezerros, cabritos ou cordeiros) e enzimas microbianas produzidas por fungos e bactérias são os mais comuns (Di Rosa et al., 2024). No entanto, devido à crescente demanda por queijo, preocupações éticas, restrições de fornecimento, preferências alimentares e restrições regulatórias, fontes alternativas ao coalho têm sido exploradas (Liu et al., 2021; Nicosia et al., 2022; Li et al., 2024). Assim, a tendência e a pesquisa atuais têm buscado a aplicação de coagulantes de origem vegetal para atender às limitações dos coagulantes atualmente disponíveis (Kumar & Sasmal, 2020; Fresno et al., 2023).

Diversas proteases derivadas de plantas são capazes de coagular o leite, mas a proteólise excessiva pode reduzir o rendimento e causar amargor, limitando sua utilidade (Shah & Mir, 2019). Uma exceção são as proteases aspárticas presentes na flor do cardo (*Cynara cardunculus* L.), tradicionalmente utilizadas na produção de queijos espanhóis e portugueses com selo de Denominação de Origem Protegida (DOP), onde a atividade coagulante está associada principalmente à presença das cardosinas A e B (Liburdi et al. 2019; Barracosa et al., 2021).

As mesmas cardosinas foram identificadas nas flores da alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*), evidenciando seu potencial tecnológico de coagulação do leite durante a fabricação de queijos (De Jesus et al., 2024; Onelli et al., 2026), podendo ser cultivada com maior facilidade, apresentando menor variabilidade que as flores silvestres para utilização como agente coagulante (Colombo et al., 2020).

Embora os extratos de cardo e alcachofra sejam reconhecidos por sua atividade proteolítica e capacidade de coagular o leite, ainda são limitados os estudos comparativos que integrem sua caracterização tecnológica a resultados obtidos na fabricação de queijos. Nesse contexto, parâmetros como concentração de proteínas, atividade proteolítica, atividade coagulante do leite e índice de especificidade (Onelli et al., 2025), aliados a métodos de

caracterização do perfil proteico, por cromatografia líquida de exclusão por tamanho e técnicas espectroscópicas vibracionais (De Jesus et al., 2023; Onelli et al., 2025), têm se mostrado ferramentas relevantes para avaliação de coagulantes vegetais.

Variações no perfil proteolítico dos coagulantes vegetais afetam diretamente a formação da rede de caseínas durante a etapa de coagulação, resultando em diferenças na firmeza do gel e na dinâmica de sinerese, mesmo sob condições tecnológicas semelhantes (Benheddi & Hellal, 2019; Akbar et al., 2025). Estudos demonstram que coagulantes vegetais, incluindo extratos de *Cynara cardunculus* L., promovem alterações significativas nas propriedades físico-químicas, estruturais e sensoriais de queijos frescos, permitindo associar as características bioquímicas do coagulante ao desempenho tecnológico do produto final (El-Salam et al., 2017; Chavez et al., 2024).

Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi caracterizar coagulantes vegetais comerciais e o extrato da flor de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*), por meio de medidas analíticas e técnicas instrumentais, avaliando seus efeitos nas propriedades físico-químicas, de textura e perfil proteômico de queijo frescal utilizando técnicas espectroscópicas no infravermelho médio (MIR) e próximo (NIR).

2. Materiais e Métodos

2.1 Amostras

Coagulantes vegetais líquidos de dez marcas comerciais foram obtidos de quatro países. Do total de amostras adquiridas, quatro foram produzidas na Itália (A, E, F e G), quatro na Espanha (B, C, J e L), uma na Bélgica (D) e uma nos Estados Unidos da América (Z). De acordo com as informações fornecidas nos rótulos e nas fichas técnicas, os produtos são descritos como agentes coagulantes de origem vegetal, destinados à coagulação do leite, obtidos principalmente a partir de extratos das partes florais de cardo (*Cynara cardunculus* L.). Em dois coagulantes (A e J), os fabricantes relataram a presença de misturas de proteases de origem vegetal, provenientes de cardo e de outras espécies vegetais.

Flores de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) foram obtidas comercialmente de plantas cultivadas em São Roque (São Paulo, Brasil) (23°3'1045"S, 47°08'07" W). Para a produção dos extratos vegetais, 35 g de pistilos de flor de alcachofra secos a 25 °C ± 1 °C foram moídos em um almofariz e adicionados a 500 mL de água destilada. Essa

mistura permaneceu em repouso por 24 horas à $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, ao abrigo da luz. Os extratos foram filtrados em papel filtro quantitativo (Unifil, C40, 18,5 cm) (De Jesus et al., 2023).

Como referência, foram utilizados coalho de cordeiro e cabrito (Cuajos Caporal, Espanha) e coalho de bezerro (Sacco System, Itália), correspondentes aos coagulantes animais 1, 2 e 3, respectivamente, e coagulante microbiana (*Aspergillus niger* var. *awamori*) (HÁ-LA®, Chr. Hansen, Brasil). O leite em pó desnatado de vaca (Molico®, Nestlé) foi adquirido em Évora (Portugal).

2.2 Caracterização dos coagulantes

2.2.1 Concentração de proteínas

A concentração de proteínas dos coagulantes foi determinada de acordo com o método de ligação do corante Azul de Coomassie (Bradford, 1976) utilizando albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como padrão. As proteínas foram detectadas medindo-se a absorbância a 595 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800, Duisburg, Alemanha).

2.2.2 Atividade proteolítica (AP)

A atividade proteolítica (AP) dos coagulantes foi determinada utilizando o método modificado de Mohanty et al. (2003). O substrato foi preparado dissolvendo 1% (m/v) de caseína bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em tampão fosfato de sódio 10 mmol L^{-1} (pH 6,5). O ensaio foi realizado incubando 1 mL do substrato com 100 μL de coagulante vegetal ou 50 μL dos coalhos animais e coagulante microbiano a $(37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C})$ em banho termostático (Tecnal, modelo Te-184, São Paulo, Brasil) por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 4 mL de ácido tricloroacético (TCA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 6,5% (m/v). Em seguida a solução foi centrifugada (MPW-350, Varsóvia, Polônia) a $4500 \times g$ por 20 min à temperatura ambiente $(25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C})$. Para o branco, o substrato foi adicionado após a inativação da enzima por TCA. A absorbância do sobrenadante foi medida a 280 nm usando espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800, Duisburg, Alemanha). Para avaliar a atividade proteolítica, uma curva padrão foi construída medindo a absorbância a 280 nm de diluições seriadas de $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de solução de L-tirosina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Uma unidade de atividade enzimática (U/mL) (Equação 1) foi definida como a quantidade de enzima

necessária para produzir 1,0 µmol de equivalente de L-tirosina em 1 mL de meio de reação por minuto.

$$\text{Atividade enzimática (U/mL)} = \frac{(\mu\text{g mL}^{-1} \text{ eq de tirosina} \times \text{fator de diluição})}{(\text{volume de enzima utilizado} \times \text{tempo (min)})} \quad (\text{Eq. 1})$$

A atividade proteolítica (Equação 2) foi expressa em unidades de atividade enzimática por µg de proteína, pela razão entre a atividade e a concentração de proteína no extrato.

$$AP (\mu\text{g mL}^{-1}) = \frac{\text{atividade enzimática (U/mL)}}{\text{concentração de proteínas}} \quad (\text{Eq. 2})$$

2.2.3 Atividade de coagulação do leite (ACL)

A atividade coagulação do leite (ACL) foi avaliada de acordo com a ISO/IDF (2006), usando as amostras de leite desnatado em pó (Molico®, Nestlé) reconstituído a 11% (0,5 g L⁻¹ de solução de CaCl₂ pH 6,5). Para os cálculos foram utilizados coalho de bezerro (> 98% de quimosina; < 2% de pepsina) e coalho bovino adulto (< 2% de quimosina; > 98% de pepsina) em pó (Chr. Hansen, Dinamarca). Os resultados foram apresentados em unidades internacionais de coagulação do leite por mililitro (IMCU mL⁻¹).

2.2.4 Determinação da razão de especificidade (RE)

A razão de especificidade do leite (RE) dos coagulantes vegetais, coagulante microbiano e coalhos animais é a razão entre ACL e atividade enzimática (U/mL) e foi determinada de acordo com a Equação 3 (Anusha et al., 2014).

$$RE = \frac{ACL}{\text{atividade enzimática (U/mL)}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

RE = razão de especificidade;

ACL = atividade coagulação do leite.

2.2.5 Propriedades físicas da coalhada

As características físicas da coalhada foram avaliadas pela determinação da liberação de água (LA) e da capacidade de retenção de água (CRA). Foi conduzido um ensaio de coagulação em escala laboratorial de acordo com Remeuf et al. (1989) com modificações. Após a estabilização da temperatura a 32 °C, monitorada por termômetro de imersão total (HG,

Brasil), 20 mL de leite desnatado em pó reconstituído a 11% (0,5 g L⁻¹ de solução de CaCl₂ pH 6,5) e 200 µL de coagulante foram adicionados em tubos (Ø 28,5 mm). Após a homogeneização, as amostras foram deixadas para coagulação em banho (VWR Ultrasonic Cleaner USC100T, Radnor Township, Pennsylvania, EUA) a 32 °C por 90 minutos e depois centrifugadas (3500×g, 15 min; HERMLE Z 323 K, HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Alemanha) sem corte prévio da coalhada. Após a centrifugação, o volume de soro de leite foi pesado, o coágulo foi liofilizado (Freeze Dryer Modulyo, Edwards, UK) e o peso final foi determinado pela diferença antes e depois da liofilização.

A liberação de água (LA) foi realizada segundo Lemes et al. (2016) por meio da seguinte fórmula (Equação 4):

$$LA (\%) = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

A capacidade de retenção de água (CRA) foi calculada (Equação 5) de acordo com Farnsworth et al. (2006).

$$CRA (\%) = \frac{\text{peso final do coágulo} - \text{peso do soro}}{\text{peso final do coágulo}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

2.2.6 Caracterização espectroscópica

Os coagulantes foram liofilizados (Modulyo, Edwards, Reino Unido) e analisados por espectroscopia no infravermelho médio (MIR), em equipamento FTIR-ATR (Cary 630 FTIR, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EUA), equipado com reflectância total atenuada (ATR) com célula de cristal de diamante. 0,5 g de cada amostra foi colocada individualmente no compartimento de acessórios onde incidem os raios na faixa do infravermelho (cristal de diamante). Os espectros foram obtidos no modo absorbância com resolução de 4 cm⁻¹ e 64 varreduras. O software para aquisição dos espectros foi o software Agilent MicroLab PC. Antes de cada coleta, o espectro de fundo branco foi lido e avaliado na região espectral com número de onda de 4000 a 600 cm⁻¹. Para cada amostra foram realizadas duas repetições, e a temperatura ambiente foi mantida em torno de 25 °C.

2.2.7 Caracterização cromatográfica

A separação das proteínas presentes nos coagulantes foi realizada por cromatografia de exclusão de tamanho utilizando uma coluna Acclaim™ SEC-1000 (7.8 × 300 mm, 7 µm, 1000 Å; Thermo Scientific™, EUA) acoplada a um sistema Agilent 1260 Infinity II HPLC. Um

volume de 5 μL de cada amostra foi injetado e a eluição foi conduzida em modo isocrático, empregando tampão fosfato de sódio 20 mmol L^{-1} (pH 7.0) a um fluxo de 0.2 mL min^{-1} , com tempo total de corrida de 30 min. A detecção das proteínas foi monitorada a 215 nm em detector UV (De Jesus et al., 2023). A determinação dos pesos moleculares aparentes foi realizada conforme o procedimento descrito por Iizuka e Faust (1982).

2.3 Produção do queijo fresco

Após a caracterização, os coagulantes foram comparados quanto à atividade coagulante do leite (ACL), atividade proteolítica (AP) e razão de especificidade (RE). Com base nesses parâmetros foram selecionados para produção dos queijos o coagulante vegetal comercial Z (360 IMCU mL^{-1} ; 6,27 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 18,01) e o extrato da flor de alcachofra (352 IMCU mL^{-1} ; 16,97 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 7,42), considerando a combinação de elevada atividade coagulante, atividade proteolítica moderada e adequada razão de especificidade, o que caracteriza um perfil enzimático adequado à produção de queijos frescos. O coagulante microbiano foi utilizado como coagulante de referência.

Os queijos foram produzidos utilizando três tratamentos diferentes: coagulante vegetal Z (CVZ), extrato de flor de alcachofra (EA) e coagulante microbiano (CM). Para cada produção foram utilizados 5 L de leite obtidos por ordenha mecânica em condições higiênicas adequadas de vacas mestiças (Holandês x Zebu) (14°52'30" S, 41°30'0" W). Antes da produção, o leite foi analisado quanto à acidez titulável, densidade, sólidos totais, gordura (AOAC, 2016) e pH com pHmetro (PHS3BW, Bel Equipamentos Analíticos Ltda., Piracicaba, SP, Brasil). Os valores médios encontrados foram 0,15 % de ácido láctico, 1,028 g mL^{-1} , 11,54 %, 3,59 % e 6,58, respectivamente.

O leite foi filtrado através de um filtro de náilon (Injesul, Lambari, MG, Brasil) e pasteurizado a 64 ± 1 °C durante 30 min e resfriado a 32 ± 1 °C. Foram adicionados 13 g L^{-1} de cloreto de sódio (NaCl) 2,22 M e 0,4 mL/L de solução de cloreto de cálcio 0,36 M (CaCl_2) (Coalhobar, Coalhos Bio Paraná LTDA, Alto Piquiri, PR, Brasil). A temperatura foi então ajustada para 35 °C e os coagulantes foram adicionados: 1,5 mL/L para CVZ, 8 mL/L para EA e 0,9 mL/L para CM (HA-LA®, Chr. Hansen, Brasil, 75 IMCU).

Após a coagulação (50 min), a coalhada foi cortada em cubos de 2 cm^2 , permanecendo em repouso por 10 min. Em seguida a massa foi aquecida a 36 ± 1 °C, sob agitação contínua por 10 min. Após esse período, o soro foi drenado e a massa foi moldada em formas com 8 cm de diâmetro. Os queijos foram virados a cada 15 minutos durante 1h em temperatura ambiente

(25 ± 1 °C) e mais duas vezes a cada 1h e meia durante 3h sob refrigeração (4 ± 1 °C). Ao final os queijos foram embalados a vácuo utilizando uma seladora (BS320, R. Baiao, Vila Casal, Uba, MG, Brasil) em embalagens multicamadas de náilon/polietileno (In Rio, Taquara, RJ, Brasil) e armazenadas sob congelamento (-18 ± 1 °C) até o momento das análises. Cada tratamento (CVZ, EA e CM) foi repetido três vezes, consistindo em três lotes separados.

2.3.1 Rendimento do queijo

O rendimento do queijo foi calculado segundo Onelli et al. (2026), de acordo com a Equação 6:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{peso da coalhada}}{\text{peso do leite}} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

2.3.2 Análises do soro

O soro foi medido e analisado para acidez titulável (AOAC 920.124), gordura (AOAC 920.125), proteína total (AOAC 2001.14) (AOAC, 2016) e pH em medidor digital de pH (PHS3BW, Bel Equipamentos Analíticos Ltda., Piracicaba, SP, Brasil).

2.4 Parâmetros físico-químicos e medidas analíticas dos queijos

O perfil químico e físico dos queijos foi medido em triplicata, de acordo com as metodologias descritas pela AOAC (2016). Foram determinados os teores acidez titulável (AOAC 920.124), gordura (AOAC 920.125), umidade (AOAC 926.08), cinzas (AOAC 935.42) e proteína total (AOAC 2001.14). Análises de pH foram realizadas utilizando um medidor digital de pH (PHS3BW, Bel Equipamentos Analíticos Ltda., Piracicaba, SP, Brasil).

A atividade de água (a_w) foi determinada utilizando analisador de atividade de água (AquaLab 3TE, Decagon Devices Inc., Washington, EUA). A cor foi determinada no sistema L^* , a^* , b^* , no colorímetro Colorquest XE (HunterLab, Sunset Hills Reston, VA, EUA), utilizando o sistema CIELab (CIE, 2018), previamente calibrado em uma superfície preto e branco, onde L^* representa a luminosidade ($L^* = 0$ - preto e $L^* = 100$ - branco) e a^* e b^* as coordenadas de cor responsáveis pela cromaticidade (+ a^* = vermelho e - a^* = verde, + b^* = amarelo e - b^* = azul).

A Análise de Perfil de Textura (TPA) foi realizada em septuplicata utilizando um analisador de textura (TA.HD plus, Stable Micro Systems, Reino Unido). Durante os testes amostras de 25×20 mm (altura $\times$ diâmetro) foram comprimidas por uma placa de compressão

paralela de aço inoxidável (100 mm), com compressão dupla. A taxa de deformação foi programada para 1,0 mm/s e 10 mm de compressão máxima. A programação do experimento e a coleta de dados foi realizada por meio do programa computacional Texture Expert for Windows 1.20 (Stable Micro Systems, UK). Os dados foram analisados para os parâmetros avaliados: dureza, adesividade, elasticidade e coesividade, utilizando o software Brookfield Texture Pro CT V1.4 (De Jesus et al., 2024).

2.5 Perfil espectroscópico

As amostras foram analisadas por espectroscopia no infravermelho médio (MIR), de acordo com o item 2.2.7.

Também foram obtidos dados por espectroscopia no infravermelho próximo (NIR), utilizando um espectrofotômetro NIR (SpectraStar 2500XL, Unity Scientific, Brookfield, CT, EUA) equipado com uma lâmpada de halogênio-tungstênio como fonte de luz e um detector de arseneto de índio-gálio (InGaAs). Aproximadamente 20 g de amostras foram colocadas no fundo da cápsula de quartzo e os espectros foram gerados no modo de reflectância e transformados em absorbâncias usando $\log 1/R$. A faixa espectral utilizada foi de 1100 nm a 2500 nm. Cada ponto corresponde à média de 64 varreduras, totalizando 1400 pontos. O software Unity InfoStar V3.11.3 foi utilizado para configuração, controle e aquisição de dados do espectrofotômetro.

Em ambas análises, para cada amostra foram realizadas duas repetições, e a temperatura ambiente foi mantida em torno de 25 ± 1 °C.

2.6 Desenho experimental

O desenho experimental seguiu o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quinze diferentes coagulantes (10 coagulantes vegetais comerciais, extrato aquoso da flor de alcachofra, coagulante microbiano, coalho de bezerro, cordeiro e cabrito), testados em leite bovino. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. ANOVA unidirecional foi aplicada para avaliar o efeito do tipo de coagulante sobre os parâmetros avaliados. Quando diferenças significativas foram observadas ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *Statistical Analysis System* (SAS), versão 9.1 para estudantes (*Statistical Analysis System*, 2023).

3. Resultados e Discussão

3.1 Caracterização dos coagulantes

O teor de proteínas, atividade enzimática, AP, ACL e RE foram determinados para os coagulantes vegetais comerciais, o extrato da flor de alcachofra, o coagulante microbiano e para os coalhos animais (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios $\pm$ desvio padrão do teor de proteína, atividade proteolítica, atividade de coagulação do leite e razão de especificidade para os coagulantes.

Coagulante	Caracterização				
	Teor de Proteína (mg mL ⁻¹)	Atividade enzimática (U mL ⁻¹)	AP (μg mL ⁻¹)	ACL (IMCU mL ⁻¹)	RE
Vegetal A	3,66 $\pm$ 0,02 ^c	9,39 $\pm$ 0,1 ^g	2,57 $\pm$ 0,04 ^g	215 $\pm$ 0,2 ^f	22,87 $\pm$ 3,8 ^b
Vegetal B	8,75 $\pm$ 0,01 ^a	35,00 $\pm$ 0,4 ^e	4,00 $\pm$ 0,04 ^f	380 $\pm$ 0,8 ^c	10,86 $\pm$ 0,3 ^c
Vegetal C	6,63 $\pm$ 0,03 ^b	26,31 $\pm$ 0,2 ^f	3,97 $\pm$ 0,03 ^f	286 $\pm$ 0,1 ^e	10,89 $\pm$ 0,1 ^c
Vegetal D	1,63 $\pm$ 0,01 ^d	13,23 $\pm$ 0,03 ^g	8,12 $\pm$ 0,02 ^e	80 $\pm$ 0,02 ^g	6,07 $\pm$ 0,1 ^d
Vegetal E	1,90 $\pm$ 0,03 ^d	8,54 $\pm$ 0,1 ^g	4,49 $\pm$ 0,05 ^f	199 $\pm$ 0,04 ^f	23,33 $\pm$ 0,9 ^b
Vegetal F	1,27 $\pm$ 0,01 ^e	8,05 $\pm$ 0,03 ^g	6,34 $\pm$ 0,03 ^e	127 $\pm$ 0,04 ^f	15,83 $\pm$ 0,3 ^c
Vegetal G	1,40 $\pm$ 0,01 ^e	8,61 $\pm$ 0,1 ^g	6,15 $\pm$ 0,05 ^e	181 $\pm$ 0,04 ^f	21,01 $\pm$ 0,7 ^b
Vegetal J	3,60 $\pm$ 0,01 ^c	27,88 $\pm$ 0,1 ^f	7,74 $\pm$ 0,04 ^e	365 $\pm$ 0,8 ^c	13,10 $\pm$ 0,3 ^c
Vegetal L	2,66 $\pm$ 0,01 ^b	68,97 $\pm$ 0,1 ^d	25,93 $\pm$ 0,1 ^b	358 $\pm$ 0,9 ^c	5,19 $\pm$ 0,1 ^d
Vegetal Z	3,19 $\pm$ 0,01 ^c	20,01 $\pm$ 0,3 ^f	6,27 $\pm$ 0,1 ^e	360 $\pm$ 0,9 ^c	18,01 $\pm$ 0,6 ^b
Alcachofra	2,82 $\pm$ 0,04 ^f	47,87 $\pm$ 1,4 ^c	16,97 $\pm$ 0,5 ^c	352 $\pm$ 0,05 ^c	7,42 $\pm$ 0,05 ^d
Microbiano	6,17 $\pm$ 0,02 ^c	9,02 $\pm$ 0,3 ^g	1,46 $\pm$ 0,05 ^h	240 $\pm$ 0,04 ^d	26,58 $\pm$ 0,1 ^a
Animal 1	7,90 $\pm$ 0,02 ^b	121,99 $\pm$ 0,6 ^b	15,44 $\pm$ 0,1 ^c	403 $\pm$ 0,1 ^b	3,30 $\pm$ 0,02 ^e
Animal 2	6,16 $\pm$ 0,01 ^c	91,15 $\pm$ 0,2 ^c	14,80 $\pm$ 0,03 ^c	278 $\pm$ 0,3 ^e	3,05 $\pm$ 0,01 ^e
Animal 3	8,77 $\pm$ 0,03 ^a	175,35 $\pm$ 0,3 ^a	19,99 $\pm$ 0,04 ^a	542 $\pm$ 0,5 ^a	3,09 $\pm$ 0,1 ^e

a, b, c, d, e, f, g, h Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de *Tukey* ($p > 0,05$). AP: atividade proteolítica; ACL: atividade de coagulação do leite; RE: razão de especificidade

O teor de proteínas e a AP diferiram significativamente entre as amostras avaliadas ($p < 0,05$), sem relação direta entre os parâmetros. A variabilidade observada indica diferenças na composição enzimática dos coagulantes. Para que uma protease seja considerada adequada à produção de queijos, deve apresentar baixa atividade proteolítica associada à elevada atividade de coagulação do leite (Liu et al., 2021), perfil que foi observado para os coagulantes vegetais B e Z e para o extrato da flor de alcachofra.

Os maiores valores de atividade de coagulação do leite (ACL) foram observados para os coalhos animais 3 e 1. Entre os coagulantes vegetais, as amostras B, J, L, Z e o extrato da flor de alcachofra apresentaram elevados valores de ACL, sem diferenças significativas entre si ($p > 0,05$), sendo superiores à quimosina microbiana, ao coalho animal 2 e aos demais coagulantes vegetais avaliados, reforçando sua adequação tecnológica à produção de queijos.

Alguns fatores podem interferir nas características dos coagulantes vegetais, influenciando na concentração de enzimas de coagulação do leite e, conseqüentemente, nas propriedades de coagulação do leite, tais como forma de maceração, temperatura de secagem e variedade de flores, localização geográfica, estágio de maturação na colheita, ou ainda diferenças no perfil enzimático (Gostin & Waisundara, 2019).

A relação entre atividade de coagulação do leite e atividade proteolítica, também denominada razão de especificidade (RE), é uma propriedade intrínseca das enzimas utilizadas na coagulação do leite e constitui um parâmetro central na avaliação de sua aplicabilidade tecnológica (Hang et al., 2016). O coagulante microbiano apresentou a maior RE, seguido pelos coagulantes vegetais A, E, G e Z. Esse perfil pode estar associado ao fato dessa amostra ser constituída por mucorpepsina produzida por fermentação submersa. As proteases microbianas são semelhantes à quimosina em sua especificidade para κ -CN, mas induzem níveis mais elevados de atividade proteolítica não específica (Fox et al. 2017).

Uma razão de especificidade elevada está associada à coagulação mais eficiente, maior rendimento e menor liberação de peptídeos amargos durante a maturação do queijo, ao passo que valores baixos tendem a comprometer o rendimento, a firmeza da coalhada e os atributos sensoriais do produto final (Mazorra-Manzano et al., 2013).

As propriedades físicas da coalhada foram avaliadas pela determinação da LA e CRA (Tabela 2), e observou-se que esses parâmetros diferiram significativamente entre os coagulantes avaliados ($p < 0,05$), evidenciando o impacto do perfil enzimático sobre a formação e organização da rede de caseínas durante a coagulação.

De modo geral, valores elevados de LA estiveram associados a menores valores de CRA, indicando a formação de géis mais suscetíveis à sinérese, como observado para os coagulantes vegetais B, C e J e para a quimosina microbiana. A sinérese, definida como a liberação de soro da matriz proteica do gel, exerce papel central na fabricação de queijos ao influenciar diretamente o rendimento e a qualidade do produto por meio do controle do teor de umidade da coalhada (Ismail, 2019).

O coagulante vegetal Z e o extrato da flor de alcachofra apresentaram tendência oposta, indicando maior retenção de umidade no gel. Esses resultados destacam uma compensação entre LA e CRA, na qual a redução da liberação de água está associada ao aumento da capacidade de retenção de umidade da coalhada.

Os resultados observados para o coagulante vegetal Z podem estar associados ao fato de a amostra ser obtida por extração seguida de purificação parcial das proteases das flores de cardo, resultando em um perfil enzimático mais definido. Esse processo tende a reduzir a contribuição de outras enzimas do extrato bruto, favorecendo o processo de coagulação do leite como observado em estudos nos quais a purificação parcial aumentou a razão entre a atividade de coagulação do leite e a atividade proteolítica, reduzindo a hidrólise não específica e melhorando o desempenho dos coagulantes (Salehi et al., 2017; Arbita et al., 2020).

Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvio padrão das propriedades físicas da coalhada formada por diferentes coagulantes.

Amostra	LA (%)	CRA (%)
Vegetal A	83,17 $\pm$ 0,2 ^b	26,72 $\pm$ 0,8 ^c
Vegetal B	84,66 $\pm$ 1,1 ^a	24,53 $\pm$ 4,7 ^{cd}
Vegetal C	84,58 $\pm$ 0,5 ^a	25,43 $\pm$ 4,4 ^{cd}
Vegetal D	82,56 $\pm$ 0,2 ^b	26,63 $\pm$ 1,0 ^c
Vegetal E	83,46 $\pm$ 0,7 ^b	32,01 $\pm$ 2,8 ^b
Vegetal F	83,61 $\pm$ 0,1 ^b	30,64 $\pm$ 3,0 ^b
Vegetal G	83,36 $\pm$ 0,2 ^b	27,89 $\pm$ 1,2 ^c
Vegetal J	84,99 $\pm$ 0,7 ^a	23,02 $\pm$ 2,2 ^d
Vegetal L	82,08 $\pm$ 1,0 ^b	21,31 $\pm$ 2,1 ^d
Vegetal Z	79,20 $\pm$ 0,1 ^c	37,83 $\pm$ 0,2 ^a
Alcachofra	73,84 $\pm$ 1,5 ^d	36,85 $\pm$ 2,2 ^a
Microbiano	84,83 $\pm$ 0,5 ^a	28,01 $\pm$ 1,3 ^c
Animal 1	81,62 $\pm$ 0,4 ^c	21,81 $\pm$ 1,4 ^d
Animal 2	80,94 $\pm$ 0,5 ^c	18,97 $\pm$ 3,8 ^d
Animal 3	75,21 $\pm$ 0,5 ^d	33,94 $\pm$ 2,4 ^b

a, b, c, d Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). LA: liberação de água; CRA: capacidade de retenção de água.

O coagulante vegetal A apresentou um perfil tecnológico distinto dos demais coagulantes, caracterizado por baixas ACL e AP (215 IMCU mL⁻¹ e 2,57 μ g mL⁻¹) e RE elevada (22,87). Esse comportamento esteve associado a uma reorganização da rede de caseínas caracterizada por maior liberação de água e menor capacidade de retenção de água. Esse efeito pode ser atribuído à sua composição, que combina enzimas extraídas das flores de cardo com

fitoquimosina de *Galium verum*. Essa planta também conhecida como erva-coalheira era usada tanto na Inglaterra quanto no noroeste da Espanha na coagulação do leite para a produção de queijo (Feijoo-Siota et al., 2018).

O coagulante vegetal J, possui em sua formulação proteases extraídas das flores de cardo associadas a enzimas de outras espécies vegetais, apresentou elevada atividade coagulante (365 IMCU mL^{-1}), associada a alta atividade proteolítica ($7,74 \mu\text{g mL}^{-1}$) com RE de 13,10. Esse perfil resultou em coalhadas com valores elevados de LA e baixa CRA, evidenciando coalhadas com maior suscetibilidade à sinérese. A presença de diferentes proteases pode ter contribuído para o aumento da atividade proteolítica observada, favorecendo a expulsão da fase aquosa durante a reorganização da rede de caseínas.

Os demais coagulantes vegetais (B, C, E, F, G e L) apresentaram variabilidade decorrente de diferentes combinações de ACL, AP e RE. De modo geral, esses coagulantes apresentaram elevada LA e baixa CRA, resultando em coalhadas com maior suscetibilidade à sinérese. O coagulante L apresentou elevada ACL (358 IMCU mL^{-1}) associada a alta AP ($25,93 \mu\text{g mL}^{-1}$) e baixa RE (5,19) estando associado a maior sinérese da coalhada. Esses resultados indicam que coagulantes vegetais com baixa seletividade enzimática pode comprometer a organização estrutural da coalhada, mesmo quando apresentam elevada eficiência de coagulação.

De modo geral, as amostras Animal 1, 2 e 3 apresentaram, alta ACL e AP e baixa RE, associados a elevados valores de LA e a baixa CRA, comportamento esperado para a composição enzimática de coalhos, caracterizada por diferentes proporções de quimosina:pepsina. Esses resultados indicam que, em comparação aos coagulantes vegetais com maior razão de especificidade, o uso de coalhos animais provoca maior sinérese e menor retenção de umidade na coalhada, o que pode comprometer o rendimento e a textura de queijos.

A espectroscopia MIR foi utilizada para obter informações sobre a estrutura, as vibrações moleculares e a composição química dos diferentes coagulantes. A partir dos espectros de MIR foram observadas várias bandas de absorção (Figura 1), relacionados às vibrações de grupos funcionais característicos.

Para os coagulantes vegetais comerciais e o extrato da flor de alcachofra (Figura 1A) foram observadas 8 bandas principais, enquanto para a quimosina microbiana e coalhos animais foram identificados 7 bandas (Figura 1B), destacando-se intensidades diferentes de absorção entre o grupo de coagulantes vegetais e o do coagulante microbiano e coalhos animais.

Em ambos os grupos, as bandas na região de 3300 cm^{-1} estão associadas às vibrações de estiramento O–H e N–H, típicas de proteínas e água ligada, enquanto as bandas próximas a $2925\text{--}2947\text{ cm}^{-1}$ correspondem ao estiramento C–H de cadeias alifáticas (Cardoso et al., 2023). De acordo com De Jesus et al., (2023) as regiões entre 1700 e 1500 cm^{-1} ($1593\text{--}1587\text{ cm}^{-1}$) são atribuídas predominantemente às bandas de amida I e II e descrevem o comportamento da estrutura secundária das proteínas presentes nos diferentes coagulantes.

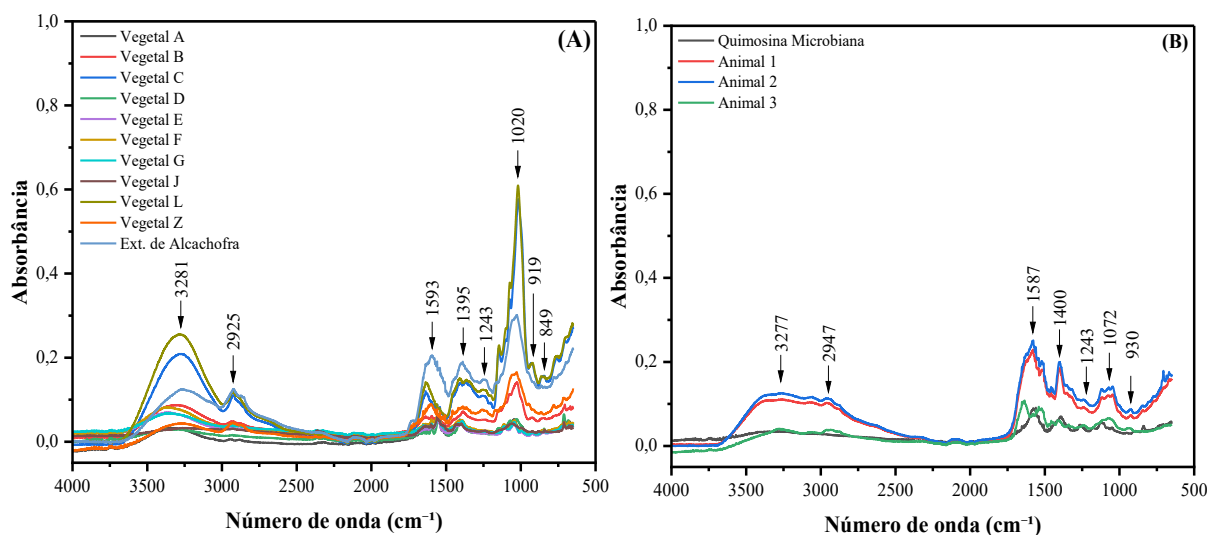


Figura 1. Caracterização por espectroscopia no infravermelho médio (MIR) de: A) coagulantes vegetais líquidos comerciais (A, B, C, D, E, F, G, J, L e Z) e do extrato da flor de alcachofra (*Cynara cardunculus L. var. scolymus*); B) coagulante microbiano (*Aspergillus niger var. awamori*) e coalhos animais (1–3: cordeiro, cabrito e bezerro, respectivamente).

A espectroscopia MIR revela as vibrações moleculares, principalmente modos de estiramento e deformação, produzindo um perfil químico característico da amostra (Ayvaz et al., 2022). Os coagulantes vegetais C e L apresentaram maior intensidade nas bandas em 3281 cm^{-1} , associadas às vibrações de estiramento N–H e O–H, e em 1017 cm^{-1} , atribuída principalmente ao estiramento de ligações C–O e C–N na região *fingerprint* (De Jesus et al., 2023). Em contraste, os coalhos animais 1 e 2 exibiram bandas mais intensas em 1587 e 1400 cm^{-1} , relacionadas, respectivamente, às vibrações da amida II (C–N/N–H) e à deformação angular de grupos metileno, indicando diferenças na composição e organização molecular em comparação aos demais coagulantes avaliados.

A distribuição das proteínas dos coagulantes foi avaliada por diferença de peso molecular. Os perfis obtidos por cromatografia de exclusão por tamanho evidenciaram que, embora as amostras apresentem picos em regiões de eluição semelhantes, destacam-se diferenças na distribuição e na intensidade relativa das frações proteicas (Figura 2).

Ao comparar os cromatogramas, observa-se que diferentes coagulantes apresentaram picos em regiões de eluição entre 10–23 min, sugerindo a presença de frações proteicas semelhantes. Nos coagulantes vegetais comerciais, como D e J, bem como no extrato da flor de alcachofra (Figura 2A), esses picos apresentaram maiores intensidades relativas, acompanhadas por frações adicionais. De acordo com De Jesus et al. (2023), essas diferenças podem estar relacionadas a variações na concentração de proteases e à presença de outros componentes.

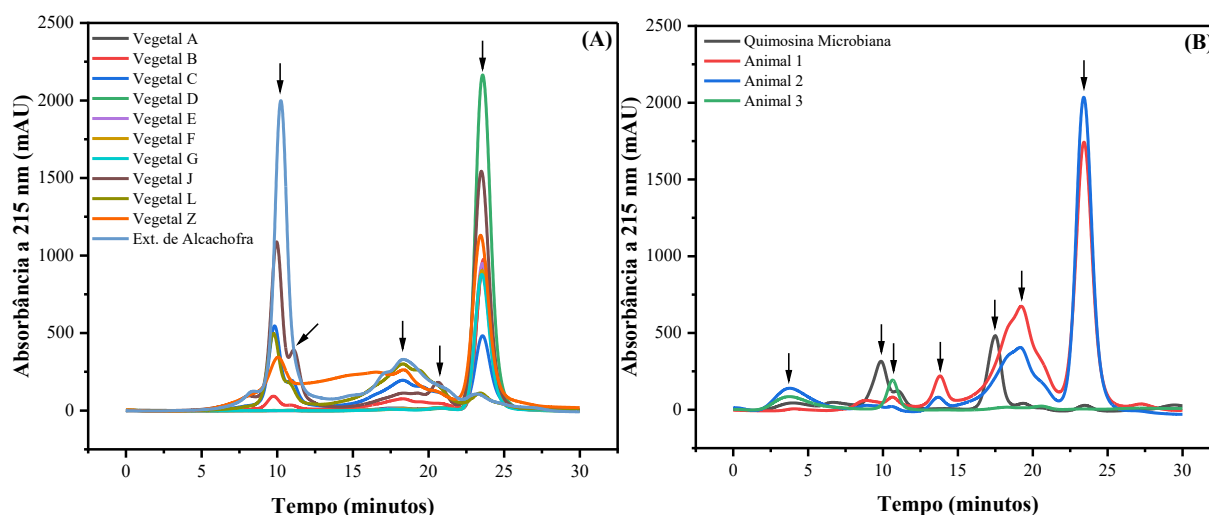


Figura 2. Perfis cromatográficos por exclusão molecular de: A) coagulantes vegetais comerciais (A, B, C, D, E, F, G, J, L e Z) e do extrato da flor de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*); B) coagulante microbiano (*Aspergillus niger* var. *awamori*) e coalhos animais (1–3: cordeiro, cabrito e bezerro, respectivamente).

Em contraste, os coalhos animais 1 e 2 (Figura 2B) exibiram perfis caracterizados por picos mais definidos e intensos em regiões específicas do cromatograma entre 19–23 min. A presença de picos adicionais de menor intensidade sugere a coexistência de outras proteínas ou outras frações proteicas não identificadas, refletindo a complexidade composicional dos coagulantes. Essas variações são consistentes com os resultados de teor de proteínas e com as diferenças observadas nos perfis espectrais de MIR, e podem estar associadas às variações de atividade proteolítica observadas entre os coagulantes.

Compreender os mecanismos bioquímicos e as implicações tecnológicas dos diferentes agentes coagulantes é essencial para otimizar a produção de queijo, melhorar a diversidade de produtos e atender às preferências em evolução dos consumidores e das partes interessadas da indústria (Sachan & Karnwal, 2022).

3.2 Parâmetros físico-químicos, analíticos e espectroscópicos dos queijos

Os parâmetros físico-químicos, analíticos e o rendimento dos queijos produzidos com coagulante vegetal Z (CVZ), extrato da flor de alcachofra (EA) e coagulante microbiano (CM) são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios $\pm$ desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos, analíticos, de textura e rendimento dos queijos produzidos com coagulante vegetal Z (CVZ), extrato da flor de alcachofra (EA) e coagulante microbiano (CM).

Parâmetro	Coagulante		
	CVZ	EA	CM
pH	6,53 $\pm$ 0,3 ^a	6,5 $\pm$ 0,03 ^a	6,72 $\pm$ 0,09 ^a
Acidez (% w/v)	0,45 $\pm$ 0,1 ^a	0,40 $\pm$ 0,04 ^a	0,23 $\pm$ 0,04 ^b
Gordura (% w/w)	21,50 $\pm$ 1,1 ^a	18,51 $\pm$ 1,8 ^b	22,51 $\pm$ 0,8 ^a
Umidade (% w/w)	59,49 $\pm$ 1,9 ^b	61,90 $\pm$ 1,0 ^a	57,40 $\pm$ 2,0 ^b
Cinzas (% w/w)	2,19 $\pm$ 0,2 ^a	1,94 $\pm$ 0,2 ^a	2,06 $\pm$ 0,2 ^a
Proteína Total (% w/w)	13,88 $\pm$ 1,7 ^{ab}	12,20 $\pm$ 0,4 ^b	14,56 $\pm$ 0,3 ^a
a _w	0,991 $\pm$ 0,002 ^a	0,991 $\pm$ 0,004 ^a	0,992 $\pm$ 0,002 ^a
L*	85,72 $\pm$ 0,6 ^c	89,58 $\pm$ 0,6 ^b	90,17 $\pm$ 0,8 ^a
a*	1,94 $\pm$ 0,6 ^a	1,68 $\pm$ 0,1 ^b	1,20 $\pm$ 0,5 ^b
b*	16,19 $\pm$ 0,6 ^a	16,30 $\pm$ 0,6 ^a	16,06 $\pm$ 1,3 ^a
Dureza (N)	1,19 $\pm$ 1,2 ^b	0,93 $\pm$ 2,7 ^c	3,08 $\pm$ 2,6 ^a
Adesividade (mJ)	-0,16 $\pm$ 2,6 ^b	-0,13 $\pm$ 2,7 ^b	-0,62 $\pm$ 3,7 ^a
Elasticidade (mm)	3,9 $\pm$ 0,1 ^a	2,6 $\pm$ 0,1 ^a	4,3 $\pm$ 0,1 ^a
Coesividade	0,42 $\pm$ 0,1 ^a	0,42 $\pm$ 0,2 ^a	0,45 $\pm$ 0,2 ^a
Rendimento (%)	16,65 $\pm$ 1,6 ^a	19,04 $\pm$ 2,2 ^a	19,28 $\pm$ 0,6 ^a

^{a, b, c} Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os parâmetros pH, atividade de água e teor de cinzas não diferiram entre os queijos produzidos com os três agentes coagulantes. Em contrapartida, acidez titulável, teores de gordura, umidade, proteína total, parâmetros de cor L* e a*, bem como dureza e adesividade, apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre pelo menos dois dos tratamentos avaliados. Resultados semelhantes têm sido descritos em estudos que avaliaram a produção de queijos utilizando diferentes agentes coagulantes, incluindo coagulantes vegetais, nos quais pH, atividade de água e teor de cinzas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Zikiou & Zidoune, 2018; Colombo et al., 2020).

A acidez titulável foi significativamente maior nos queijos produzidos com CVZ e EA em relação ao CM, sem diferença entre os dois coagulantes vegetais ($p < 0,05$). El-Salam et al.

(2017) também relataram valores de maior acidez titulável em queijos produzidos com coagulantes vegetais, associando esse comportamento principalmente à maior atividade proteolítica dos extratos de flores de alcachofra.

Observou-se que os queijos produzidos com EA apresentaram maior teor de umidade e menor teor de gordura em comparação aos demais tratamentos o que pode ser atribuído à maior capacidade de retenção de água da coalhada formada por esse coagulante, conforme evidenciado pelos maiores valores de CRA e menor LA observados durante a etapa de coagulação. Os valores observados são semelhantes aos reportados por Chavez et al. (2024) para queijos frescos produzidos com papaína liofilizada, os quais apresentaram teores de umidade entre aproximadamente 60 e 65% e conteúdo lipídico próximo a 20%.

O teor de proteína foi maior nos queijos produzidos com CM, em comparação aos queijos produzidos com coagulantes vegetais. Comportamento semelhante foi observado por Colombo et al. (2020), que relataram menor teor de proteína em mini queijos produzidos com o extrato da flor de alcachofra. Esse resultado está associado à maior especificidade da quimosina pela ligação Phe₁₀₅–Met₁₀₆ da κ -caseína, favorecendo uma coagulação mais eficiente e, consequentemente, maior incorporação de proteína à coalhada, enquanto as proteases encontradas em plantas do gênero *Cynara* apresentam especificidade mais ampla, refletida em maior atividade proteolítica e menor razão de especificidade, conforme observado na caracterização dos coagulantes vegetais (Esposito et al., 2016; Alavi & Momen, 2020).

A textura dos queijos foi avaliada por meio da TPA e diferenças significativas foram observadas para os parâmetros dureza e adesividade ($p < 0,05$), enquanto elasticidade e coesividade não diferiram entre os coagulantes avaliados. Entre os coagulantes vegetais, CVZ e EA apresentaram menores valores de adesividade, não diferindo entre si, enquanto que o uso de EA como coagulante, resultou em queijos com menor dureza. Resultados semelhantes foram encontrados por El-Salam et al. (2017) para queijo branco fresco, no qual o uso de extrato bruto da flor de alcachofra como agente coagulante resultou em queijos com menor dureza, enquanto não foram observadas diferenças significativas na elasticidade.

A cor é um atributo relevante na percepção da qualidade do produto e contribui, juntamente com sabor e textura, para a avaliação global do alimento (Akbar et al., 2025). Diferenças significativas foram observadas nos parâmetros L^* e a^* ($p < 0,05$). Os queijos produzidos utilizando CM apresentaram maior luminosidade, parâmetro associado à dispersão da luz pela matriz proteica, que contribui para o aspecto mais claro do produto (Singh et al., 2023). Em relação ao parâmetro a^* , todos os valores foram positivos, sendo o coagulante CVZ

com maior contribuição do eixo vermelho na coloração dessa amostra. Em relação ao valor b^* , não foram observadas diferenças entre os queijos analisados, indicando o mesmo nível de tonalidade amarela.

O rendimento percentual dos queijos não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos avaliados ($p > 0,05$), o que está de acordo com estudos relacionados à substituição da quimosina por extrato da flor de alcachofra na fabricação de queijos (Colombo et al., 2020; Onelli et al., 2025). Esse resultado evidencia que, apesar das diferenças observadas na caracterização funcional dos coagulantes, o uso do EA foi tecnologicamente equivalente ao coagulante de referência em termos de rendimento nas condições avaliadas.

Os parâmetros físico-químicos do soro resultante da produção dos queijos são apresentados na Tabela 4. Os parâmetros físico-químicos dos soros obtidos não diferiram entre os tratamentos, com exceção do teor de proteína.

Tabela 4. Valores médios $\pm$ desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos do soro dos queijos produzidos com coagulante vegetal Z (CVZ), extrato da flor de alcachofra (EA) e coagulante microbiano (CM).

Parâmetros	Coagulante		
	CVZ	EA	CM
pH	$6,27 \pm 0,07^a$	$6,32 \pm 0,05^a$	$6,30 \pm 0,1^a$
Acidez (% v/v)	$0,11 \pm 0,01^a$	$0,10 \pm 0,004^a$	$0,10 \pm 0,01^a$
Gordura (% m/v)	$0,80 \pm 0,3^a$	$0,70 \pm 0,1^a$	$0,60 \pm 0,2^a$
Proteína Total (% m/v)	$0,64 \pm 0,02^{ab}$	$0,70 \pm 0,02^a$	$0,60 \pm 0,05^b$

^{a, b, c} Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

O extrato de alcachofra (EA) apresentou maior teor de proteína no soro quando comparado ao coagulante microbiano (CM), enquanto o coagulante vegetal Z (CVZ) não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos. Resultado semelhante foi encontrado por Onelli et al. (2025), que observaram diferença significativa entre extrato de flor de alcachofra e quimosina microbiana apenas para o teor de proteína do soro obtido, com maiores valores associados ao uso do extrato vegetal, atribuindo esse comportamento à maior especificidade da quimosina microbiana.

Esse resultado é consistente com o menor teor de proteína observado nos queijos produzidos com EA, refletindo menor retenção proteica durante a etapa de coagulação em comparação ao CM. Apesar das diferenças observadas no teor de proteína e na umidade, o

rendimento dos queijos não diferiu entre os tratamentos, indicando que o extrato de alcachofra pode ser considerado um coagulante viável para a produção de queijo fresco.

A Figura 3 apresenta os perfis espectroscópicos de queijos produzidos utilizando diferentes coagulantes, obtidos nas regiões do infravermelho NIR e MIR. De modo geral, os espectros de ambas regiões evidenciaram perfil espectral semelhante entre os tratamentos, sendo as diferenças relacionadas à intensidade das bandas.

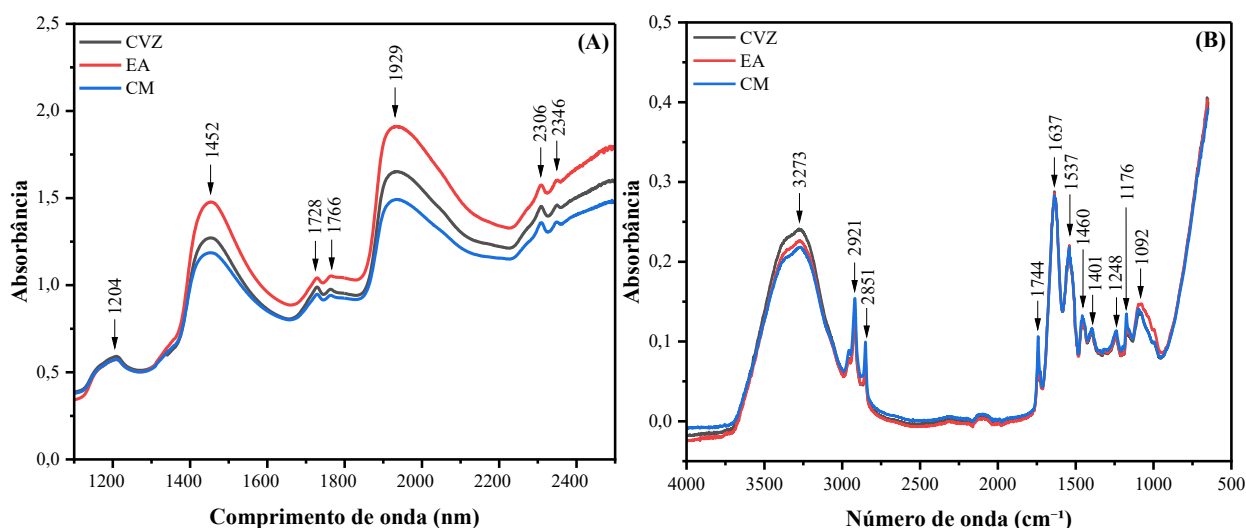


Figura 3. Espectros obtidos por espectroscopia no infravermelho de queijos produzidos com coagulante vegetal Z (CVZ), extrato da flor de alcachofra (EA) e coagulante microbiano (CM): (A) dados brutos de NIR e (B) dados brutos de MIR.

Técnicas espectroscópicas no infravermelho próximo e médio têm sido utilizadas na análise das características físico-químicas de queijos. Os espectros de NIR apresentaram bandas largas e sobrepostas ao longo da região espectral analisada (Figura 3A). As principais bandas de absorção observadas estão associadas à água (O–H), em torno de 1452 e 1926 nm, a lipídios (C–H/CH₃), nas regiões de 1204, 1728, 1766, 2306 e 2346 nm, e a proteínas (N–H/NH₃), associadas às bandas próximas de 2306 e 2346 nm (De Jesus et al., 2020; Cardoso et al., 2025).

A análise dos espectros de MIR (Figura 3B) evidenciou bandas características associadas predominantemente à matriz proteica, com destaque para as regiões de amida I, em torno de 1634 cm⁻¹, e amida II, em torno de 1537 cm⁻¹, atribuídas às vibrações C=O, C–N e N–H. Adicionalmente, foram observadas bandas largas associadas à água na região de estiramento O–H, em torno de 3273 cm⁻¹, típicas de amostras com elevado teor de umidade (De Jesus et al., 2020; Silva et al., 2021).

Os espectros obtidos em ambas regiões apresentaram diferenças relacionadas à intensidade das bandas, sem alterações no padrão espectral das amostras. Os queijos produzidos

utilizando coagulantes vegetais apresentaram maiores intensidade de absorção do que as observadas para CM. Esse comportamento é compatível com as diferenças observadas em parâmetros como umidade, teor de gordura e proteína, indicando que o uso dos diferentes coagulantes resultou em queijos com composição comparável.

4. Conclusão

Os resultados evidenciaram ampla variabilidade funcional e tecnológica entre os coagulantes vegetais comerciais, associada a diferenças no perfil enzimático, na razão de especificidade e na organização estrutural da coalhada. Entre os coagulantes avaliados, os coagulantes vegetais B e Z, bem como o extrato da flor de alcachofra, destacaram-se por apresentar elevada atividade de coagulação do leite e baixa atividade proteolítica associada a resultando em razões de especificidade compatíveis com a aplicação tecnológica na produção de queijos. Em contraste, coagulantes como L, D e J, embora apresentassem elevada atividade de coagulação, exibiram maior atividade proteolítica e menor seletividade enzimática, estando associados a maior sinérese da coalhada, o que indica restrições para sua aplicação nas condições avaliadas.

A utilização do coagulante vegetal Z e do extrato da flor de alcachofra na produção de queijo fresco determinou a estrutura da coalhada, refletindo-se em queijos com maior teor de umidade, menor dureza e composição físico-química comparável àquela obtida com o coagulante microbiano. As análises espectroscópicas (MIR e NIR) indicaram perfis espectrais semelhantes entre os queijos, com diferenças restritas à intensidade das bandas, coerentes com as variações observadas na composição. Assim, nas condições avaliadas, tanto o coagulante vegetal Z quanto o extrato da flor de alcachofra demonstraram desempenho tecnológico comparável ao coagulante microbiano, confirmando sua viabilidade como agentes coagulantes alternativos para a produção de queijo fresco.

Agradecimentos

Os autores agradecem a BIOSTAR S.A., Laboratórios Arroyo S.A. e *Cuajos Caporal* pelo gentil fornecimento de amostras, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Alimentos (PPGECAL) e à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB).

5. Referências

- Akbar, A., Nabeel, M. I., Siddiqui, A. J., Musharraf, S. G. (2025). Effect of coagulants on physicochemical properties, texture, color and microstructure of cow milk cheese. *Food Chemistry: X*, 31, 103197. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.103197>
- Alavi, F., Momen, S. (2020). Aspartic proteases from thistle flowers: Traditional coagulants used in the modern cheese industry. *International Dairy Journal*, 107, p. 104709. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104709>
- Anusha, R., Singh, M. K., Bindhu, O. S. (2014). Characterisation of potential milk coagulants from *Calotropis gigantea* plant parts and their hydrolytic pattern of bovine casein. *Eur. Food Res. Technol.*, 238, 997. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2177-0>
- AOAC. (2016). Official Methods of Analysis (18th ed., 3rd rev.). Washington, DC.
- Arbita, A. A., Paul, N. A., Cox, J., Zhao, J. (2020). Extraction, partial purification and characterization of proteases from the red seaweed *Gracilaria edulis* with similar cleavage sites on κ -casein as calf rennet. *Food Chemistry*, 330, 127324. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127324>
- Ayvaz, H., Zreyas, A., Zreyas, V., Rodriguez-Saona, L. (2022). Infrared Spectroscopy in Dairy Analysis. In: Mcsweeney, P. L. H., Mcnamara, J. P. Encyclopedia of dairy sciences. 3^a ed. London, UK: Elsevier, p.405-420. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00035-0>
- Barracosa, P., Oliveira, J., Pires, E., Barros, M., Gomes, S. (2021). Proteolytic activity of cardoon flower extracts and impact on cheese quality. *Foods*, 10, 1271. <https://doi.org/10.3390/foods10061271>
- Benheddi, N., Hellal, A. (2019). Milk-clotting properties and proteolytic activity of plant proteases: technological implications for cheese manufacture. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13, 2307–2316. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03828-0>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cardoso, K. L. R., de Jesus, J. C., Dargère, A. F., Capela, A. P., Oliveira, T. F., Carvalho, G. R., Santos, L. S., Faria, P. B., Ferrão, S. P. B. (2025). Discrimination of artisanal Minas cheeses according to geographical origin using spectroscopic and chromatographic techniques associated with chemometrics. *Food Chemistry*, 484, 144466. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144466>
- Chavez, G. V., Chávez, S. G., Rivera Botonares, R., Vilca Valqui, N. C., Zuta Puscan, M., Oliva, M., Tineo, D. (2024). Fresh cheese production using freeze-dried papain as a vegetable coagulant. *Brazilian Journal of Food Technology*, 27, e2024006. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.00624>
- Colombo, F., Gigliotti, C., Chiavaro, E., Corradini, C. (2020). Milk-clotting properties of artichoke flower extract: Biochemical and technological aspects. *Food Research International*, 136, 109478. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109478>
- Commission Internationale de L'Éclairage (CIE); *Colorimetry*, 4th Edition.; CIE Publication: Vienna, 2018. <https://doi.org/10.25039/TR.015.2018>.
- De Jesus, J. C., Reis, L. C. C., Santos, M. P. F., Santos, L. S., Ferrão, S. P. B. (2023). Chemical characterization of aspartic protease from artichoke flower (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*) using MIR spectroscopy and analytical measurements. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 34, 1520-1530. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20230065>
- De Jesus, J. C., Silva, G. J., Gonçalves, B. R. F., Souza, M. R., Santos, L. S., Ferrão, S. P. B. (2020). Quick identification of the time of maturation of artisanal Minas cheese by FTIR-ATR spectroscopy and multivariate techniques. *Journal of the Brazilian Chemical Society*,

- 31, p. 2001–2011. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190233>
- De Jesus, J. C., Tolentino, I. C. S. A., Reis, L. C. C., Conceição, D. G., Onelli, R. R. V., Santos, L. S., Ferrão, S. P. B. (2024). Biofunctional, chemical and sensory profile of mature cheese produced with artichoke flower coagulant (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*). *International Dairy Journal*, 156, 105976. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.105976>
- Di Rosa, A. R., Accetta, F., Nicosia, F. D., Litrenta, F., Pino, A., Lopreiato, V., Caggia, C., Randazzo, C. L. (2024). Microbiological, chemical, and artificial sensory assessment of Sicilian cheeses made using different milk-clotting enzymes. *Food Bioscience*, 59, 103917. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103917>
- El-Salam, B. A. E. Y., Ibrahim, O. A. E.-H., El-Sayed, H. A. E.-R. (2017). Purification and characterization of milk-clotting enzyme from artichoke (*Cynara cardunculus* L.) flowers as coagulant in white soft cheese. *International Journal of Dairy Science*, 12, 254–265. <https://doi.org/10.3923/ijds.2017.254.265>
- Esposito, M., Di Pierro, P., Dejongh, W., Mariniello, L., Porta, R. (2016). Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) Leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease. *Food Chemistry*, 204, p. 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.060>
- Farnsworth, J. P., Li, J., Hendricks, G. M., Guo, M. R. (2006). Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. *Small Ruminant Res.*, 65, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.05.036>
- Feijoo-Siota, L., Rama, J. L. R., Sánchez-Pérez, A., Villa, T. G. (2018). Expression, activation and processing of a novel plant milk-clotting aspartic protease in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 268, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.006>
- Fox, P. F., Guinee, T. P. (2022). Overview of cheese. In: McSweeney, P. L. H., McNamara, J. P. (Eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences* (3rd ed., pp. 250–261). London, UK: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00093-3>
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. H. (2017). Enzymatic coagulation of milk. In: Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. H. (Eds.). *Fundamentals of Cheese Science* (2nd ed., pp. 185–229). Boston, MA: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_7
- Fresno, M., Fernández-Salguero, J., Gómez, R., Carmona, M. A. (2023). Plant rennets in cheese manufacture: Technological aspects and quality implications. *Food Chemistry*, 404, 134590. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134590>
- Gomes, S., Pina, I., Fernandes, J., Dias, J., Reboredo, F., Martins, A. P. L., Alvarenga, N. (2024). Comparative Study of Coagulation Dynamics: Cardoon Flower Extract vs. Chymosin. *Dairy*, 5, 817–827. <https://doi.org/10.3390/dairy5040059>
- Gostin, A. I., Waisundara, V. Y. (2019). Evaluation of plant proteases as milk-clotting enzymes and their influence on curd properties. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43, e14130. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14130>
- Hang, F., Wang, Q., Hong, Q., Liu, P., Wu, Z., Liu, Z., Zhang, H., Chen, W. (2016). Purification and characterization of a novel milk-clotting metalloproteinase from *Paenibacillus* spp. BD3526. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 547–554. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.028>
- Iizuka, T., Faust, R. M. (1982). Detection and Characterization of Naturally Occurring Plasmids in *Bacillus cereus* Isolates by Agarose Gel Electrophoresis. *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University*, 60, 263–274.
- Ismail, H. A. (2019). Characterization of milk clotting properties of adult cattle rennet modified with *Moringa oleifera* seeds and its suitability as calf rennet alternative in cheese making. *Zagazig J. Agric. Res.*, 46, 739–755. <https://doi.org/10.21608/zjar.2019.40962>
- ISO/IDF. (2006). Milk and milk products — Ovine and caprine rennets — Determination of

- total milk-clotting activity. ISO 23058 | IDF 199. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- Kumar, A., Sasmal, S. (2020). Rheological and physico-chemical properties of milk gel using isolate of pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds: A new source of milk clotting peptidase. *Food Hydrocolloids*, 106, 105866. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105866>
- Lemes, A. C., Pavón, Y., Lazzaroni, S., Rozycki, S., Brandelli, A., Kalil, S. J. (2016). A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development. *LWT- Food Science and Technology*, 66, 217-224. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.038>
- Li, Y., Zhong, Y., Xing, F., Huang, A., Wang, X. (2024). Comparative analysis of the quality of buffalo milk fresh cheese processed with *Moringa oleifera* seed milk coagulant and calf rennet. *Journal of Dairy Science*, 107, 10571-10583. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25451>
- Liburdi, K., Benucci, I., Esti, M. (2019). Characterization of plant-derived coagulants and their suitability for cheese production. *Journal of Food Biochemistry*, 43, e12764. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12764>
- Liu, X., Wu, Y., Guan, R., Jia, G., Ma, Y., Zhang, Y. (2021). Advances in research on calf rennet substitutes and their effects on cheese quality. *Food Research International*, 149, 110704. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110704>
- Mazorra-Manzano, M. A., Perea-Gutiérrez, T. C., Lugo-Sánchez, M. E., Ramírez-Suarez, J. C., Torres-Llanez, M. J., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B. (2013). Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. *Food Chemistry*, 141, 1902–1907. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.042>
- Mohanty, A. K., Mukhopadhyay, U. K., Kaushik, J. K., Grover, S., Batish, V. K. (2003). *J. Dairy Res.* 70, 37-43. <https://doi.org/10.1017/S0022029902005927>
- Nicosia, F. D., Puglisi, I., Pino, A., Caggia, C., Randazzo, C. L. (2022). Plant milk-clotting enzymes for cheesemaking. *Foods*, 11, 871. <https://doi.org/10.3390/foods11060871>
- Onelli, R. R. V., De Jesus, J. C., Lins, R. P., Capela, A. P., Soares, L. S., Ferrão, S. P. B. (2026). Technological innovation in the production of matured buffalo cheese using artichoke flower extract (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) as a coagulant: organic acid profile, proteomic and sensory study. *International Dairy Journal*, 173, 106491. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2025.106491>
- Onelli, R. R. V., De Jesus, J. C., Lins, R. P., Capela, A. P., Soares, L. S., Ferrão, S. P. B. (2025). Behavior of aspartic proteases from artichoke flower (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) in the hydrolysis of buffalo milk casein. *Journal of Food Science*, 90, e70773. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.70773>
- Remeuf, F., Lenoir, J., Duby, C. (1989). Étude des relations entre les caractéristiques physico-chimiques des laits de chèvre et leur aptitude à la coagulation par la présure. *Le Lait*, 69, 499-518. <https://doi.org/10.1051/lait:1989634>
- Sachan, R. S. K., Karnwal, A. (2022). Advancement in cheese production technology. Singh, J., Vyas, A. In: *Advances in Dairy Microbial Products*. p. 191-208. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85793-2.00023-0>
- Salehi, M., Aghamaali, M. R., Sajedi, R. H., Asghari, S. M., Jorjani, E. (2017). Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withania coagulans* fruit. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 847-854. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.034>
- Santiago-López, L., Aguilar-Toalá, J. E., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Córdova, B., Liceaga, A. M., González-Córdova, A. F. (2018). Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption. *Journal of Dairy Science*, 101, 3742–3757. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13465>

- Shah, M. A., & Mir, S. A. (2019). Plant proteases in food processing. In J.-M. MÉRillon, & K. G. Ramawat (Eds.), *Bioactive molecules in food* (pp. 443e464). Cham, Switzerland: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6_68
- Silva, L. K. R., de Jesus, J. C., Onelli, R. R. V., Conceição, D. G., Santos, L. S., Ferrão, S. P. B. (2021). Discriminating Coalho cheese by origin through near and middle infrared spectroscopy and analytical measures. *International Journal of Dairy Technology*, 74, p. 393–403. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12767>
- Singh, T. P., Arora, S., Borad, S. G., Bam, J., Paul, V., Thomas, R., Sarkar, M. (2023). Fatty acid and amino acid profiling, antioxidant activity and other quality characteristics of vacuum packed cheddar style-yak milk cheese during ripening. *Food Bioscience*, 51, 102213. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102213>
- Statistical Analysis System. (2023). Statistical analysis system (SAS), student version. USA: SAS Institute Inc.
- Zikiou, A., Zidoune, M. N. (2018). 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*, 72, 89-99. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12563>

CAPÍTULO V: Conclusões Gerais

Conclusões Gerais

Esta tese apresentou uma avaliação abrangente do comportamento enzimático e tecnológico do extrato da flor de alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) para coagulação do leite de diferentes espécies, com ênfase na sua aplicação como alternativa aos coagulantes vegetais à base de cardo (*Cynara cardunculus* L.) e aos coagulantes convencionais. De forma integrada, os resultados demonstraram que o desempenho desses coagulantes é dependente da composição do leite e da especificidade enzimática do agente coagulante, influenciando diretamente os parâmetros de coagulação e a proteólise inicial. Observou-se que os extratos das flores de alcachofra e cardo apresentaram maior aptidão tecnológica para leites de ovelha, cabra e búfala, nos quais foram observados maiores valores de atividade coagulante e rendimento, enquanto leites de égua e burra não coagularam nas condições avaliadas e o leite de camela apresentou formação de gel com baixa firmeza e elevada sinerese.

A caracterização dos coagulantes por meio de espectroscopia no infravermelho médio e cromatografia por exclusão molecular, confirmou que diferenças nos perfis enzimáticos se traduzem em respostas tecnológicas distintas. Essas variações foram refletidas em parâmetros como teor de proteína, atividade enzimática, propriedades físicas da coalhada e dinâmica de retenção e liberação de água, evidenciando a relação direta entre especificidade enzimática e comportamento da coagulação. De forma geral, os coagulantes vegetais não apresentaram diferenças significativas no desempenho tecnológico em relação ao coagulante microbiano, reforçando seu potencial de aplicação na indústria de laticínios.

Na aplicação tecnológica, a produção de queijo fresco a partir de leite de vaca com coagulantes vegetais selecionados evidenciou diferenças no perfil físico-químico e proteômico. Os queijos obtidos apresentaram maior acidez titulável e umidade, menores teores de gordura e proteína, menor dureza e adesividade e menor luminosidade. Esses resultados refletem o efeito da especificidade enzimática sobre a estrutura da rede proteica do leite, impactando diretamente a qualidade final do produto. Apesar dessas diferenças, o perfil tecnológico observado mostrou-se compatível com a produção de queijos frescos de muito alta umidade.

Considerando o conjunto dos capítulos desenvolvidos, evidencia-se que a interação entre a composição do leite e a especificidade enzimática constitui o principal fator modulador do desempenho tecnológico dos coagulantes. A compreensão integrada desses aspectos permite a aplicação estratégica dos coagulantes vegetais, orientando a sua seleção em função da espécie de leite, adequando às características tecnológicas desejadas no produto final.

Adicionalmente, destaca-se o extrato da flor de alcachofra como coagulante alternativo

viável, com vantagens associadas à maior disponibilidade, menor variabilidade e ao aproveitamento de subprodutos agrícolas. Sua aplicação na coagulação do leite representa uma estratégia promissora para agregação de valor e diversificação de produtos lácteos, contribuindo para a inovação no setor.