



Área de concentração: Ciência de Alimentos

PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS, ESPECTROSCÓPICAS E CROMATOGRÁFICA
DO QUEIJO SERPA PRODUZIDO COM CARDO (*CYNARA CARDUNCULUS*) COM
DIFERENTES PERFIS ENZIMÁTICOS

Discente: Renata de souza da Rocha
Orientadora: Prof.Dra.Sibelli Passini Barbosa Ferrão
Coorientadores: Dra. Cristina Conceição
Dra. Josane Cardim de Jesus

ITAPETINGA-BA
2026

RENATA DE SOUZA DA ROCHA

PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS, ESPECTROSCÓPICAS E CROMATOGRÁFICA
DO QUEIJO SERPA PRODUZIDO COM CARDO (*CYNARA CARDUNCULUS*) COM
DIFERENTES PERFIS ENZIMÁTICOS

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em
Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e
Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

ITAPETINGA-BA
2026

637.35
R576p

Rocha, Renata de Souza da.

Propriedades físicas, químicas, espectroscópicas e cromatográfica do queijo Serpa produzido com cardo (*Cynara cardunculus*) com diferentes perfis enzimáticos. / Renata de Souza da Rocha. – Itapetinga-BA: UESB, 2026.
67f.

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Área de concentração: Ciência de Alimentos. Sob a orientação da Prof.^a D. SC. Sibelli Passini Barbosa Ferrão e coorientação da D. SC. Cristina Conceição e D. SC. Josane Cardim de Jesus.

1. Queijo Serpa – Maturação – Cardo - Análises físicas e químicas. 2. Queijo Serpa – Cardo - Espectroscopia. 3. Queijo Serpa - Cardo – Perfil de voláteis. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Ferrão, Sibelli Passini Barbosa. III. Conceição, Cristina. IV. Jesus, Josane Cardim de. V. Título.

CDD (21): 637.35

Catálogo na Fonte:

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

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Queijo de leite de ovelha – Produção

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: "PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS, ESPECTROSCÓPICAS E CROMATOGRÁFICAS DO QUEIJO SERPA PRODUZIDO COM CARDÓ (CYNARA CARDUNCULUS) COM DIFERENTES PERFIS ENZIMÁTICOS."

Autor (a): RENATA DE SOUZA DA ROCHA

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

Coorientador (a): Prof.^a Dr.^a Josane Cardim de Jesus

Prof.^a Dr.^a Cristina Conceição

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



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



Prof.^a Dr.^a Grazielly de Jesus Silva
(UESC)



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

Itapetinga-BA, 26 de fevereiro de 2026.

EM TUDO DAI GRAÇAS!

1 TESSALONICENSES 5:18

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTAC.....	12
CAPÍTULO I- REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 queijos.....	18
2.1.1 queijo serpa.....	19
2.2 coagulação do leite.....	22
2.2.1 coagulação de origem vegetal.....	23
2.2.2 coagulantes com a flor do cardo (<i>cynara cardunculus</i>).....	24
2.2.3 maturação e transformações bioquímicas.....	26
2.3 características químicas dos queijos e técnicas de análises.....	27
2.3.1 avaliação da composição.....	28
2.3.2 caracterização de compostos voláteis.....	29
2.3.3 técnicas espectroscópicas.....	30
3 REFERÊNCIAS.....	32
CAPÍTULO II - OBJETIVOS.....	39
1.1 objetivo geral.....	40
1.2 objetivo específicos.....	40
CAPÍTULO III: INFLUÊNCIA DE DOIS TIPO DE CARDO (<i>CYNARA CARDUNCULUS</i>) NA MATURAÇÃO DO QUEIJO SERPA POR MEIO DAS PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS E PERFIL VOLÁTIL DOS QUEIJOS.....	41
RESUMO.....	42
1 INTRODUÇÃO.....	43
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1 obtenção do extrato e preparação do queijo.....	45
2.2 composição química e análise física e bioquímica.....	46
2.3 proteólise.....	46
2.4 lipólise.....	47
2.5 análise espectroscópica por infravermelho médio (MIR).....	48
2.6 análise espectroscópica por infravermelho próximo (NIR).....	48
2.7 extração de peptídeos solúveis em água (PSA).....	48
2.8 perfil cromatográfico dos PSA.....	49
2.9 cromatografia gasosa (GC).....	49
2.10 análise estatística.....	50
3 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	51
3.1 análises físicas e químicas.....	51
3.2 espectroscopia no infravermelho médio (MIR) e próximo (NIR).....	53
3.3 perfil de peptídeos.....	56
3.4 perfil de compostos voláteis.....	60

4 CONCLUSÃO	63
5 REFERÊNCIAS.....	64

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1: Área geográfica da produção do queijo Serpa	19
Figura 2: Selo de Denominação de origem protegida (DOP).....	19
Figura 3: Flor do Cardo.....	23

CAPÍTULO III: INFLUÊNCIA DE DOIS TIPO DE CARDO (*CYNARA CARDUNCULUS*) NA MATURAÇÃO DO QUEIJO SERPA POR MEIO DAS PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS E PERFIL VOLÁTIL DOS QUEIJOS

Figura 1: Espectros de queijos produzidos com extratos de cardos com perfis enzimáticos diferentes e maturados por 30, 60, 90 e 120 dias: (a) espectros obtidos por MIR; (b) espectros obtidos por MIR ampliado; (c) espectros obtidos por NIR	53
Figura 2: Dispersão dos Componentes Principais obtida por espectroscopia no infravermelho médio (MIR) e próximo (NIR) de queijos produzidos com extratos de cardos com perfis enzimáticos distintos e maturados por 30, 60, 90 e 120 dias: (a) bandas espectrais MIR; (b) bandas espectrais NIR.....	54
Figura 3: Cromatogramas dos peptídeos solúveis em água (PSA) de do queijo Serpa aos 30, 60, 90 e 120 dias de maturação. a) Extratos de PSA de queijos produzidos com o coagulante C1 ; b) Extratos de PSA de queijos produzidos com o coagulante C2	56
Figura 4: Dispersão dos Componentes Principais (ACP) obtida a partir do perfil cromatográfico dos peptídeos solúveis em água (PSA) de queijos produzidos com extratos de cardo com perfis enzimáticos distintos e maturados por 30, 60, 90 e 120 dias.....	58
Figura 5: Dispersão dos Componentes Principais do perfil de compostos voláteis dos queijos produzidos cardos com diferentes perfis enzimáticos ao longo da maturação. C1- Sem cardosina A. C2- Com cardosina A.....	60

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1: Principais países produtores de queijo do mundo (2024/2025).....**17**

CAPÍTULO III: INFLUÊNCIA DE DOIS TIPO DE CARDO (*CYNARA CARDUNCULUS*) NA MATURAÇÃO DO QUEIJO SERPA POR MEIO DAS PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS E PERFIL VOLÁTIL DOS QUEIJOS

Tabela 1: Modelos de regressão para os atributos físico-químico de queijos produzidos com dois cardos com diferentes perfis enzimáticos em função do tempo de maturação**50**

Rocha, R.S. Propriedades físicas, químicas, espectroscópicas e cromatográficas do Queijo Serpa produzido com cardo (*Cynara cardunculus*) com diferentes perfis enzimáticos. Itapetinga – BA: UESB, 2025. 67p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos).

RESUMO

O queijo Serpa é um queijo tradicional português, produzido com leite cru de ovelha, cujas características sensoriais estão associadas ao uso de coagulante vegetal de *Cynara cardunculus*. Nesse contexto, objetivou-se avaliar o impacto de cardos com diferentes perfis enzimáticos nas características do queijo Serpa ao longo da maturação, por meio da análise de composição, perfil espectroscópico e perfil de voláteis. Os queijos foram produzidos com dois cardos de diferentes perfis enzimáticos, C1 (sem cardosina A) e C2 (com cardosina A), sendo avaliados aos 30, 60, 90 e 120 dias de maturação. Foram avaliadas a composição química, propriedades físicas e frações de nitrogênio, visando compreender as transformações e a evolução da proteólise durante a maturação. As espectroscopias no infravermelho próximo (NIR) e médio (MIR) foram empregadas para identificação de grupos funcionais da matriz do queijo, enquanto a cromatografia líquida em fase reversa (RP-HPLC) e a cromatografia gasosa (CG) foram utilizadas para análise do perfil de peptídeos e de compostos voláteis, respectivamente. Os dados físico-químicos e as frações de nitrogênio foram avaliados por ANOVA e modelos de regressão, e os dados espectroscópicos, peptídicos e de voláteis por análise de componentes principais (ACP). Cloretos, gordura e elasticidade apresentaram comportamento linear, enquanto umidade, atividade de água, adesividade e L^* exibiram comportamento quadrático; já a lipólise e a coordenada a^* diferiram entre C1 e C2. As análises MIR e NIR evidenciaram variações na absorção de água, lipídios e proteínas ao longo da maturação, influenciadas pelo tempo e pelo coagulante, com maior intensidade em C1. Para C2, observou-se comportamento distinto, com maior absorbância aos 120 dias, seguido de 60, indicando influência diferenciada ao longo da maturação. A ACP reforçou esses resultados, evidenciando diferença de agrupamento entre os tratamentos C1 e C2, principalmente aos 30 dias de maturação. A análise dos peptídeos solúveis em água evidenciou perfis proteolíticos distintos, com C1 promovendo acúmulo progressivo de peptídeos mais hidrofóbicos em estágios avançados e C2 maior liberação de peptídeos nos estágios iniciais, seguida de redução ao longo da maturação. Os compostos voláteis variaram com a maturação, com predominância de aminas e lactonas em C2 aos 30 dias e maior complexidade aromática em estágios avançados, sob influência do tempo e do coagulante. Os

resultados mostraram que C1 e C2 influenciaram de forma diferente a maturação do queijo Serpa, afetando a proteólise, o perfil de peptídeos e os compostos voláteis, com destaque para o melhor desempenho de C2, que apresentou maior lipólise, perfil peptídico mais expressivo e maior desenvolvimento de compostos voláteis.

Palavras chaves: Flor do cardo; Cardosina; Maturação

Rocha, R.S. Physical, chemical, spectroscopic, and chromatographic properties of Serpa cheese produced with cardoon (*Cynara cardunculus*) with different enzymatic profiles. Itapetinga – BA: UESB, 2025. 65 p. Dissertation (Master's in Food Engineering and Science, Concentration Area: Food Science).

ABSTRACT

Serpa cheese is a traditional Portuguese cheese produced from raw ewe's milk, whose sensory characteristics are associated with the use of vegetable coagulant extracted from *Cynara cardunculus*. In this context, this study aimed to evaluate the impact of cardoons with different enzymatic profiles on the characteristics of Serpa cheese during maturation, through the analysis of composition, spectroscopic profile, and volatile compounds. Cheeses were produced using two cardoons with distinct enzymatic profiles, C1 (without cardosin A) and C2 (with cardosin A), and evaluated at 30, 60, 90, and 120 days of maturation. Chemical composition, physical properties, and nitrogen fractions were analyzed to understand transformations and the evolution of proteolysis during maturation. Near-infrared (NIR) and mid-infrared (MIR) spectroscopies were used to identify functional groups associated with the cheese matrix, while reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and gas chromatography (GC) were employed to analyze peptide profiles and volatile compounds, respectively. Physicochemical data and nitrogen fractions were evaluated using ANOVA and regression models, while spectroscopic, peptide, and volatile data were analyzed using principal component analysis (PCA). Chlorides, fat, and elasticity showed linear behavior during maturation, whereas moisture, water activity, adhesiveness, and L* exhibited quadratic behavior; lipolysis and a* coordinate differed between C1 and C2. MIR and NIR analyses revealed variations in absorbance associated with water, lipids, and proteins throughout maturation, influenced by time and coagulant, with higher intensity observed in C1. For C2, a distinct pattern was observed, with higher absorbance at 120 days, followed by 60 days, indicating a different influence during maturation. PCA confirmed the separation between treatments, particularly at 30 days. The analysis of water-soluble peptides showed distinct proteolytic profiles, with C1 promoting progressive accumulation of more hydrophobic peptides at advanced stages, while C2 showed greater peptide release in early stages followed by reduction over time. Volatile compounds varied during maturation, with predominance of amines and lactones in C2 at 30 days and increased aromatic complexity at later stages, influenced by time and coagulant. Overall, results demonstrated that C1 and C2

differently influenced Serpa cheese maturation, affecting proteolysis, peptide profiles, and volatile compounds, with C2 showing better performance, characterized by higher lipolysis, more expressive peptide profile, and greater development of volatile compounds.

Keywords: Cardoon flower; Cardosin; Maturation

CAPÍTULO I

REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

O queijo destaca-se não apenas pelo elevado consumo em diversos países mas também pelo seu alto valor nutricional, sendo reconhecido como uma importante fonte de proteínas de alto valor biológico, lipídios e vitaminas essenciais (Martin *et al.*, 2024). Diante disso, a fabricação de queijos está consolidada em escala global, sendo impulsionada pelos avanços tecnológicos na ciência e tecnologia de alimentos.

No entanto, a produção baseada em práticas tradicionais ainda se mantêm relevantes em diversos contextos. Nesse cenário, Portugal se destaca por preservar uma sólida tradição artesanal, pois grande parte da produção nacional ainda ocorre em pequena escala, sendo considerada uma arte, em que a experiência e o conhecimento empírico do queijeiro desempenham papel essencial na definição das características do produto (Alvarenga *et al.*, ;Barracosa *et al.*,).

Os queijos portugueses ocupam posição de destaque no cenário internacional devido à sua diversidade, identidade regional e forte vínculo com práticas tradicionais de produção. Desenvolvidos principalmente a partir de leite de vaca, ovelha ou cabra, esses queijos apresentam ampla variedade de sabores, aromas e texturas, características que resultam da combinação entre o tipo de leite utilizado, o coagulante e as condições ambientais de maturação (Caeiro *et al.*,).

Entre os queijos artesanais mais tradicionais de Portugal, destaca-se o queijo Serpa, de Denominação de Origem Protegida (DOP), produzido na região do Baixo Alentejo. Produzido com leite cru de ovelha e coagulado com extrato vegetal de *Cynara Cardunculus* (flor do cardo), este queijo possui uma textura amanteigada, especialmente nos estágios iniciais de maturação (Ghribi *et al.*, 2022). Essa característica resulta da ação do coalho vegetal, aliado ao elevado teor de gordura do leite de ovelha, que contribui para suavidade da massa (Araújo-Rodrigues *et al.*, 202).

A textura do queijo Serpa está diretamente relacionada ao processo de coagulação do leite, no qual ocorre a hidrólise enzimática das micelas de caseína, levando à agregação das proteínas e à separação do soro (Santos, 2023). No caso do queijo Serpa esse processo é promovido pelas enzimas proteolíticas presentes no extrato de cardo, uma planta nativa da região do Mediterrâneo, de grande importância para a produção de queijos (Benheddi e Hellal,2019).

O extrato do cardo contém enzimas que, além de coagular o leite, promovem reações bioquímicas responsáveis pelo desenvolvimento da textura amanteigada, do sabor intenso e

do aroma levemente picante do queijo Serpa (Mandim *et al.*, 2023). Essas enzimas pertencem à classe das proteases aspárticas, pois possuem dois resíduos de ácido aspártico no sítio ativo, o que lhes permite catalisar a hidrólise das ligações peptídicas. Dentre essas proteases, destacam-se as cardosinas A,B,E,F,G e H (Barracosa *et al.*, 2021). Outro fator importante é a variabilidade do perfil enzimático do cardo, que pode ser influenciado pelo ecótipo, pela região de cultivo e pelo tempo de colheita. Essas variações interferem diretamente no perfil de próteses, podendo resultar em diferentes desempenho tecnológico durante a produção do queijo (Conceição., 2018; Barracosa *et al.*, 2021).

É fundamental compreender as diferenças entre as cardosinas, isoladas ou combinadas, pois essas enzimas impactam diretamente a textura, o sabor e a qualidade final do queijo (Alvarenga *et al.*, 2025). Além disso, é necessário ter uma padronização e entender como essas enzimas vão agir na coagulação, pensando no produto final, já que, isoladas ou combinadas, podem promover características diferentes no queijo, o que pode interferir no paladar de consumidores (Gomes *et al.*, 2024).

Além do papel da coagulação vegetal, o processo de maturação exerce influência direta sobre as características finais do queijo Serpa, sendo fundamental para o desenvolvimento de suas propriedades típicas (Alvarenga *et al.*, 2025). Durante a maturação, ocorrem transformações bioquímicas, principalmente associadas à proteólise e à lipólise, que contribuem para a formação da textura, do sabor e do aroma característico desse queijo (Barracosa *et al.*, 2021). Essas reações podem ser potencializadas de acordo com o perfil enzimático presente no extrato de cardo utilizado (Gomes *et al.*, 2024). De modo que a variabilidade enzimática impacta diretamente a velocidade e a extensão das reações bioquímicas responsáveis pelo desenvolvimento das características estruturais e sensoriais durante a maturação.

Para investigar o impacto das cardosinas nas características finais do queijo Serpa, é essencial utilizar técnicas analíticas que permitam identificar e quantificar os compostos voláteis e os peptídeos gerados durante a maturação. A cromatografia gasosa (GC) permite a análise dos compostos voláteis, responsáveis pelo perfil aromático do queijo, enquanto a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC-RP) possibilita a caracterização dos peptídeos formados ao longo da maturação (De Jesus *et al.*, 2024).

Embora pesquisas ou estudos anteriores tenham demonstrado que extratos vegetais podem alterar parâmetros sensoriais, aromáticos, físicos e químicos em queijos maturados, poucos estudos exploram a correlação entre a variabilidade enzimática do cardo e as transformações bioquímicas desencadeadas durante a maturação. Dessa forma objetivou-se

avaliar o efeito de diferentes perfis enzimáticos obtidos de cardo (*Cynara Cardunculus*) nas propriedades do queijo Serpa, considerando a composição físico- química e os perfis proteolíticos, de compostos voláteis e espectroscópico ao longo da maturação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Queijos

O queijo é definido como o produto obtido pela coagulação do leite, seguida pela remoção do soro (Texeira *et al.*, 2021). A produção de queijos tem origens milenares, remontando a aproximadamente 10 mil anos a.C., sendo transmitida de geração em geração e aprimorada até os métodos modernos utilizados atualmente (Guiné e Florença, 2020). Esse processo envolve etapas fundamentais que determinam as características físicas, químicas e sensoriais do produto final (Conceição *et al.*, 2018).

De acordo com o relatório Agricultural Outlook 2025-2034, publicado pela Organisation for Economic Co-operation and Development e pela Food and Agriculture Organization of the United Nations (OECD-FAO), a produção e o consumo de produtos lácteos processados, como queijo, devem continuar crescendo na próxima década. Por conta do aumento da renda e da urbanização em países de baixa e média renda, bem como pela maior demanda global por alimentos de origem animal. De acordo os dados do USDA Foreign Agricultural Service (FAS) sobre produção global de queijo, a produção mundial em 2024/2025 foi estimada em cerca de 22,3 milhões de toneladas, com forte participação da União Europeia e dos Estados Unidos no total agregado (USDA-FAS, 2025), como mostra na Figura 1.

Mercado	% Produção Global	Produção total (2024/2025) toneladas métricas
União Europeia	48%	10,78 milhões
Estados Unidos	29%	6,46 milhões
Rússia	5%	1,16 milhão
Brasil	3%	780.000
Canadá	2%	514.000
Argentina	2%	500.000
Reino Unido	2%	494.000
México	2%	474.000
Austrália	2%	426.000
Nova Zelândia	2%	410.000

Tabela 1 - Principais países produtores de queijo no mundo (2024/2025) **Fonte:** United States Department of Agriculture – Foreign Agricultural Service (USDA/FAZ- ano 2024/2025).

A produção de queijo é uma das atividades mais relevantes da indústria láctea, pois envolve transformações físico-químicas e bioquímicas que determinam as características do produto final. As principais etapas desse processo incluem a coagulação, a drenagem do soro, a salga e, quando necessário, a maturação (Nicosia *et al.*, 2022). A produção de queijo se inicia com a coagulação, que pode ser ácida ou enzimática, utilizando coagulantes de origem animal, vegetal ou microbiana. Além disso, o tempo de maturação representa um fator determinante nas características finais do produto, variando de acordo com cada tipo de queijo e impactando sabor, textura e aroma (Atasever; Mazlum, 2024).

Outros fatores também influenciam a produção de queijo e podem variar conforme a biodiversidade regional. Condições climáticas, tipo de pastagem, composição vegetal e do leite dos animais afetam de forma significativa o processo de fabricação, conferindo características únicas aos queijos de cada região (Tabet *et al.*, 2023).

Entre os diferentes tipos de queijo produzidos mundialmente, destacam-se alguns queijos tradicionais portugueses, como Serra da Estrela, Azeitão e Serpa, os quais são elaborados a partir de leite cru de ovelha e apresentam características distintas em função da sua origem geográfica, do processo de fabricação e do uso de coagulante vegetal. Nesse contexto, a produção de queijo em Portugal apresenta relevância no cenário agroalimentar, tendo atingido 86.466 toneladas em 2023, segundo dados do Instituto Nacional de Estatística (INE), com valores próximos a 90 mil toneladas nos anos anteriores, o que evidencia uma relativa estabilidade na produção nacional.

2.1.1 Queijo Serpa

O queijo Serpa possui semelhanças com o queijo Serra da Estrela em Portugal, já que ambos possuem processo de produção semelhante. No entanto, eles são produzidos em regiões distintas e utilizam leite de raças diferentes de ovelhas, o que resulta em características únicas para cada variedade (Araújo-Rodrigues *et al.*, 2020).

Serpa é um queijo português maturado, originado na região do Baixo Alentejo (sul de Portugal) (Figura 2), e possui selo de Denominação de Origem Protegida (DOP), uma certificação que visa proteger e defender os interesses culturais, históricos e econômicos de uma determinada região (Santos *et al.*, 2017). Além disso, por ser um produto com selo DOP (Figura 3), possui um elevado valor cultural e econômico agregado. Esse fator impulsiona o

comércio local, fortalece a agricultura familiar e consequentemente estimula o turismo na região (Dias, 2022).

Figura 1: Área geográfica da produção do queijo Serpa



Fonte: Queijaria Charrua (2025)

Figura 2: Selo de Denominação de origem protegida (DOP)



Fonte: Queijaria Guilherme (2022)

O queijo Serpa é produzido a partir de leite cru de ovelha, sendo tradicionalmente utilizado o coagulante vegetal obtido de *Cynara cardunculus* (cardo), cuja aplicação é obrigatória para produtos com certificação DOP. De acordo com Araújo (2020), os queijos Serpa possuem atributos sensoriais únicos, como, sabor, textura e aroma, resultado da

interação de diversos fatores, incluindo o uso de leite de ovelhas provenientes de várias espécies de raças tradicionais da região do Alentejo, como a Merina Branca e a Campaniça. Essas raças são bem adaptadas às condições climáticas e às pastagens locais, o que influencia diretamente a composição do leite, especialmente no perfil lipídico e proteico, refletindo-se nas propriedades sensoriais do queijo. Além disso, o uso do cardo, o tempo de maturação e o modo artesanal de fabricação atuam de forma integrada na definição das características finais do queijo Serpa (Santos *et al.*, 2017 ; Conceição *et al.*, 2018).

No início do processo de maturação, o queijo Serpa apresenta uma textura semi-mole, cremosa e amanteigada. Devido ao seu alto teor de gordura e umidade, proporciona uma sensação de derretimento na boca. Sua textura pode variar de semi-mole a macia, dependendo do grau de maturação e do processo de fabricação. Quando cortado, o queijo Serpa amanteigado tende a se deformar lentamente, podendo também apresentar uma leve elasticidade e facilidade de derretimento. Com o avanço da maturação, sua estrutura se torna mais consistente e firme (Serol, 2017).

O sabor é marcante e picante, intensificando-se com a maturação. O aroma também evolui com esse tempo, queijos com menor tempo de maturação são caracterizados por notas lácteas e frescas, enquanto aqueles mais maturados revelam traços mais intensos, incluindo aroma amanteigados, frutados, terrosos e nuances de compostos sulfurados. Essas características derivam da lipólise, que gera ácidos graxos livres, cetonas, lactonas, e da proteólise que libera aminoácidos os quais podem ser convertidos em aldeídos, álcoois, ácidos e compostos sulfurados por meio de reações bioquímicas que ocorrem durante o tempo de maturação (Alvarenga, 2008; Alvarenga *et al.*, 2025; Barracosa *et al.*, 2021; Bettencourt e Pinheiro, 2008). Macedo *et al.* (2025) identificaram compostos associados a aromas como acetoin, diacetil e 2,3-butanodiol, presentes em queijos, enquanto compostos como ácido caprílico, caproato e 3-metilindol foram mais abundantes em queijos com menor aceitação.

A coloração da massa varia conforme o estágio de maturação. Com pouco tempo de maturação é amarelo-claro, tornando-se amarelo-dourado com o tempo. Já a casca pode apresentar tonalidades entre amarelo-alaranjado e amarelo-acastanhado, conferindo ao queijo um aspecto visual atrativo (Alvarenga *et al.*, 2025; Dias, 2022).

O processo de produção inicia-se com a filtração do leite de ovelha, com o objetivo de remover impurezas. Em seguida, realiza-se a coagulação, uma etapa importante na produção, pois é a partir dela que se desenvolvem as características desejáveis do queijo. Essa fase ocorre em um período de 50 a 60 minutos, utilizando-se como coagulante o extrato

enzimático obtido das flores secas da *Cynara cardunculus* (flor de cardo). A quantidade de coagulante adicionada varia conforme sua atividade enzimática e as propriedades do leite utilizado (Rodrigues *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2023).

Após a coagulação, a coalhada é cortada para facilitar a liberação do soro e controlar a consistência da massa. Em seguida, realiza-se a drenagem do soro excedente, essencial para alcançar a umidade desejada. Após essa etapa, a massa é colocada manualmente em moldes e compactada, com o objetivo de eliminar bolsas de ar e garantir a uniformidade do queijo (Rodrigues *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2023).

O queijo então segue para a etapa de maturação (cura), que ocorre em ambiente com temperatura e umidade controladas e pode variar de 30 a 120 dias, dependendo do tipo de queijo desejado (mais cremoso ou mais firme). Durante a maturação, também são realizadas lavagens regulares da crosta, que contribuem para o desenvolvimento das características sensoriais típicas do queijo Serpa (Bettencourt *et al.*, 2008).

2.2 Coagulação do leite

A coagulação do leite pode ocorrer por meio de coagulantes de origem vegetal, animal ou microbiana. Historicamente os primeiros queijos foram produzidos de forma acidental, quando pastores nômades transportavam leite em sacos feitos com estômagos de animais, ricos em enzimas coagulantes. Com o calor e o movimento durante o transporte, o leite se separava em coalhada e soro, formando um alimento sólido, mais estável e de maior durabilidade (Mazorra *et al.*, 2018). A partir disso, o coagulante natural mais utilizado passou a ser o do abomaso de bezerros, devido à alta concentração de quimosina, uma enzima essencial para a coagulação eficiente do leite (Corrigan *et al.*, 2021).

A quimosina é o coagulante mais utilizado mundialmente, e é uma enzima proteolítica, ou seja, degrada proteínas em fragmentos menores. No leite, atua especificamente sobre a κ -caseína. A clivagem ocorre entre os aminoácidos fenilalanina (Phe105) e metionina (Met106), resultando na formação de dois fragmentos: Para- κ -caseína, que é hidrofóbica e permanece na micela, e o glicomacropeptídeo (GMP), que é hidrofílico e é liberado para a fase aquosa do leite (Barracosa *et al.*, 2021).

Com o passar do tempo, foram introduzidas alternativas, como as enzimas de coagulação recombinantes, produzidas por micro-organismos geneticamente modificados, com o objetivo de suprir a crescente demanda por queijo e contornar limitações associadas ao uso do coalho de origem animal, como disponibilidade e custo. No entanto, existem algumas barreiras, como restrições religiosas, dietas específicas e a resistência de consumidores aos

produtos geneticamente modificados. Além disso, observa-se uma tendência crescente na indústria de alimentos pela valorização de ingredientes naturais. Todos esses fatores impulsionaram os estudos em busca de coagulantes de origem vegetal, como as proteases aspárticas (Mazorra-Manzano *et al.*, 2018).

2.2.1 Coagulante de origem vegetal

Os coagulantes de origem vegetal são substâncias extraídas de plantas que vêm ganhando destaque como alternativas sustentáveis e adequadas a consumidores com restrições alimentares, como por exemplo pessoas com restrições religiosas. Essas enzimas estão presentes em plantas da família Asteraceae, sendo o *Cynara cardunculus* a espécie mais utilizada na produção de queijos, além de possuírem boa capacidade de coagular o leite, esses coagulantes conferem características sensoriais, físicas e químicas únicas aos queijos (Alavi e Momen, 2020). O uso dessas enzimas traz inovação ao mercado, adicionando atributos diferenciados aos produtos. No entanto, é necessário garantir a padronização, já que a variabilidade enzimática representa um desafio a ser superado (Conceição *et al.*, 2018).

As indústrias têm investido em coagulantes vegetais, pois eles atendem a crescente demanda por alternativas éticas e sustentáveis em substituição à quimosina, tradicionalmente extraída do estômago de ruminantes jovens (Ghribi *et al.*, 2022). Queijos de regiões tradicionais, como o Queijo Serpa (DOP), são produzidos com coagulantes vegetais, o que amplia as possibilidades de mercado e atende a novos perfis de consumidores (Alvarenga *et al.*, 2025).

Existem várias aplicações para esses extratos vegetais, e cada um possui características de composição diferentes, que variam de acordo com a espécie da planta, o clima, o solo e sua variabilidade enzimática. Entre as principais fontes, destacam-se os extratos vegetais de *Cynara* sp., *Carica papaya* e *Ficus* sp., que apresentam atividade proteolítica importante para a coagulação, embora a especificidade da enzima seja determinante para a formação de uma coalhada adequada (Alavi e Momen, 2020). Outro fator importante é que algumas enzimas presentes nos extratos vegetais podem causar defeitos no queijo, como gosto amargo, perda de rendimento e alterações na textura, especialmente quando apresentam atividade proteolítica excessiva ou baixa especificidade (Nicosia *et al.*, 2022; Fox *et al.*, 2017).

2.2.2 Coagulação com a flor do Cardo (*Cynara cardunculus*)

A *Cynara cardunculus* (Figura 4), conhecida como cardo, pertence à família Asteraceae, caracterizada pelas flores organizadas em capítulos, que são inflorescências compostas que se assemelham a uma única flor. Nativa da região do Mediterrâneo, a planta é mais frequentemente encontrada em países como Espanha, Itália, Grécia, Portugal e no sul da França (Gomes *et al.*, 2019).

Figura 3: Flor do cardo



Fonte: CYNARA TEC (2025)

Essa espécie apresenta três formas principais de compatibilidade cruzada: o cardo cultivado (*Cynara cardunculus* var. *altilis* DC.), a alcachofra (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L. Fiori) e seu ancestral comum, o cardo selvagem (*Cynara cardunculus* var. *sylvestris* Lamk Fiori). Essa diversidade ressalta a importância da planta do ponto de vista agrícola e genético, por oferecer múltiplas possibilidades de cultivo e aplicação (Gominho *et al.*, 2018).

Além de sua importância biológica e cultural, o cardo se destaca pelo bom rendimento, resistência a mudanças climáticas e baixa exigência em manejo agrônomo. Outro benefício relevante é sua contribuição para o melhoramento das propriedades do solo e dos aspectos biológicos do ecossistema onde é cultivado, o que reforça seu valor sustentável (Barbosa *et al.*, 2020).

O extrato da flor do cardo possui um conjunto de proteases aspárticas, conhecidas genericamente como cardosinas, entre as quais estão descritas cardosina A, B, C, D, E e F,

além de outras enzimas em menor proporção. Embora cada uma apresente características estruturais e funções específicas, todas participam em algum nível dos processos de coagulação (Barracosa *et al.*, 2021), contribuindo para o desenvolvimento das características sensoriais dos queijos obtidos com esse coagulante vegetal. Entre elas, destacam-se as cardosinas A e B, que são as mais abundantes e tecnologicamente relevantes. Ambas são glicoproteínas compostas por duas subunidades polipeptídicas e se acumulam nos estiletes e estigmas das flores, localizando-se principalmente nos vacúolos das papilas estigmáticas e nas células epidérmicas do estilete (Gomes *et al.*, 2024; Alvarenga *et al.*, 2025). Essas enzimas atuam diretamente sobre a κ -caseína, promovendo sua clivagem e iniciando a formação do gel (Conceição *et al.*, 2018). Embora o mecanismo seja semelhante ao da quimosina, o uso do cardo confere a queijos características marcantes, como sabor mais intenso, textura cremosa e um perfil aromático mais complexo (Alavi e Momen, 2020).

Apesar da tradição e da riqueza sensorial do queijo Serpa, um dos principais desafios enfrentados por pequenos produtores continua sendo a variabilidade natural na composição enzimática dos extratos de cardo. Essa variabilidade envolve tanto diferenças quantitativas (nível de atividade enzimática), quanto qualitativas (conjunto de proteases presentes), o que influencia diretamente o perfil de coagulação e a intensidade da proteólise, refletindo em alterações sensoriais entre os lotes (Folgado e Abranches, 2019). A variabilidade na composição enzimática dos extratos de cardo pode ocorrer não apenas devido à origem da planta, o tempo de cultivo e às condições ambientais, mas também entre diferentes lotes de flores de cardo, refletindo diferenças no perfil de proteases presentes (Barracosa *et al.*, 2021).

A cardosina A já é sintetizada em sua forma ativa na planta e está presente nas partes superiores das flores, com maior concentração nos vacúolos das células. No entanto, sua atividade pode ser influenciada por fatores como a disponibilidade do substrato (κ -caseína) e a temperatura. Já a cardosina B é inicialmente produzida como uma enzima inativa e necessita passar por modificações estruturais específicas, que envolvem a remoção de partes do seu peptídeo precursor, para se tornar funcional. Fatores como mudanças no pH e interações com membranas celulares podem facilitar essa ativação (Barracosa *et al.*, 2021).

A presença ou ausência das cardosinas A e B proporciona diferentes aspectos ao queijo, influenciando diretamente sua textura e sabor. Garrido (2017) estudou a influência do cardo na coagulação do leite de ovelha e observou que a cardosina B é menos específica do que a cardosina A, o que impactou o sabor dos queijos. Folgado e Abranches (2019) analisaram as características das cardosinas A e B e verificaram que a cardosina A apresenta

semelhança com a quimosina, enquanto a cardosina B se assemelha à pepsina. Esses resultados indicam que cada enzima contribui de maneira distinta à matriz do queijo.

As enzimas cardosina A e B atuam de forma diferente sobre as caseínas do leite devido às diferenças em sua especificidade e atividade proteolítica. A cardosina A é mais específica, promovendo a clivagem da κ -caseína entre os aminoácidos fenilalanina (Phe105) e metionina (Met106), atuando de forma análoga à quimosina na função de coagulação do leite. Já a cardosina B possui uma ação menos específica e mais proteolítica, degradando diversas proteínas do leite ao longo do processo, o que a aproxima da pepsina. Enquanto a cardosina A é essencial para a coagulação, a cardosina B tem um papel mais relevante na proteólise durante a maturação do queijo, influenciando sua textura e sabor (Gomes *et al.*, 2024; Mohsin *et al.*, 2024).

2.2.3 Maturação e transformações bioquímicas

A maturação é uma das etapas mais importantes na produção do queijo Serpa, pois é nela que ocorrem transformações bioquímicas que moldam a textura, o sabor e o aroma característicos desse queijo. Entre essas transformações, destacam-se a proteólise, mais relacionada à textura, e a lipólise, responsável principalmente pelo desenvolvimento do sabor (Rodrigues *et al.*, 2021).

A proteólise é dividida em proteólise primária e proteólise secundária. A proteólise primária ocorre por meio da hidrólise das caseínas α 1-, α 2- e β -caseína, causada pela ação das cardosinas A e B presentes no cardo. Essas enzimas clivam ligações peptídicas das proteínas estruturais do queijo, originando peptídeos grandes e médios. Essa ruptura inicial enfraquece a matriz proteica e promove o amolecimento da pasta, resultando na cremosidade típica observada nos estágios iniciais da maturação do queijo Serpa (Khattab *et al.*, 2019). Estudos como o de Araújo *et al.* (2020) reforçam esse efeito, registrando aumento das frações de nitrogênio solúvel logo nos primeiros dias de maturação em queijos produzidos com cardo.

A proteólise secundária, ocorre ao longo da maturação e corresponde à degradação dos peptídeos formados na etapa primária. Nesse processo, os peptídeos maiores são convertidos em peptídeos menores e em aminoácidos livres, que estão diretamente ligados ao desenvolvimento de aromas característicos. Essa etapa é conduzida tanto por enzimas endógenas do leite quanto pelas enzimas de culturas starter e pela microbiota naturalmente presente no queijo (Garbowska *et al.*, 2021). Conceição *et al.* (2018) relatam que a formação

de compostos de baixo peso molecular durante essa fase contribui para notas levemente picantes e complexas, frequentemente associadas a queijos de pasta mole.

Simultaneamente à proteólise ocorre a lipólise, processo catalisado pelas lipases naturais do leite, pelas enzimas provenientes do coagulante vegetal e pela atividade metabólica dos micro-organismos presentes no queijo. Essas enzimas hidrolisam as ligações éster entre os ácidos graxos e o glicerol dos triacilglicerídeos, resultando na liberação de glicerol e ácidos graxos livres, formando assim a hidrólise parcial ou total das gorduras do leite (Khatab *et al.*, 2019).

Estudos destacam que a liberação de ácidos graxos de cadeia curta, especialmente hexanóico, octanóico e decanoico aumenta ao longo da maturação e está diretamente associada ao desenvolvimento de aromas mais intensos, picantes e característicos de queijos de ovelha (Pluta-Kubica *et al.*, 2024; Saremnezhad *et al.*, 2024). Em queijos Serpa, Araújo-Rodrigues *et al.* (2022) também observaram uma presença expressiva de ácidos graxos livres de cadeia curta, especialmente hexanoico (C6), octanoico (C8) e decanoico (C10), e relacionaram esses compostos a características voláteis intensas no perfil aromático típico da variedade. Desta forma, as transformações bioquímicas que ocorrem durante a maturação determinam as características químicas e sensoriais do queijo.

2.3 Características químicas dos queijos e técnicas de análises

Embora existam estudos que tenham investigado os efeitos de coagulantes vegetais sobre as características químicas e sensoriais de queijos, ainda são escassos os trabalhos que integrem essas análises de forma conjunta, correlacionando as variações observadas com possíveis diferenças na atividade enzimática dos extratos. Tais diferenças podem estar relacionadas a fatores como a origem geográfica, estágio de maturação das flores ou métodos de extração, os quais podem influenciar a composição enzimática do coagulante vegetal. A compreensão desses efeitos é fundamental para o desenvolvimento de queijos com qualidade padronizada e perfis sensoriais específicos (Margalho *et al.*, 2021).

2.3.1 Avaliação da composição

A caracterização físico-química e bioquímica dos queijos é fundamental para compreender os efeitos das diferentes tecnologias de fabricação sobre a qualidade do produto final. Segundo Gonçalves *et al.* (2016), a composição química dos queijos pode variar conforme a matéria-prima utilizada.

A avaliação da composição do queijo ao longo da maturação envolve a avaliação de parâmetros como umidade, atividade de água (A_w), resíduo mineral fixo, cloretos, gordura no extrato seco, pH, acidez titulável e nitrogênio total, os quais permitem acompanhar as alterações estruturais e químicas do produto (Margalho *et al.*, 2021). A redução da umidade e da A_w está associada à compactação da matriz protéica e à ação do sal, que controla a migração de água por mecanismos osmóticos, enquanto as variações de pH refletem a atividade microbológica e enzimática, influenciando diretamente a textura, a estabilidade e a qualidade do queijo durante a maturação (Fox *et al.*, 2017; Serol *et al.*, 2017; Bansal; Veena, 2022).

A gordura e as proteínas desempenham papel importante no desenvolvimento das características do queijo ao longo da maturação. A lipólise promove a liberação de ácidos graxos, especialmente de cadeia curta, contribuindo para o aroma característico, enquanto a proteólise, conduzida pelas enzimas do coagulante e pelas enzimas microbianas, afeta diretamente a textura e o sabor (Alvarenga, 2008; Serol *et al.*, 2017; El-Aidie *et al.*, 2024). Essas transformações podem ser acompanhadas por meio de análises de nitrogênio, bem como por parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*) e textura, que permitem uma avaliação objetiva das mudanças físicas e bioquímicas ocorridas durante a maturação (Alavi; Momen, 2020; Rodrigues *et al.*, 2022).

No caso específico do queijo Serpa, as características físico-químicas e sensoriais estão definidas no Caderno de Especificações do Queijo Serpa DOP. De acordo com o documento, o queijo é produzido a partir de leite cru de ovelha e apresenta pasta mole a semimole, textura cremosa e aroma e sabor intenso, características resultantes das condições regionais e do processo tradicional de fabricação. A maturação ocorre sob condições controladas de temperatura (6 a 15 °C) e umidade relativa (70 a 95%), com período mínimo de 30 dias, podendo ser classificado como queijo Serpa Velho quando a maturação ultrapassa 180 dias. O regulamento estabelece teor de gordura no extrato seco igual ou superior a 45% e inferior a 60%, bem como elevada umidade no queijo isento de matéria gorda, variando entre 61 e 69% para o Queijo Serpa e podendo ser inferior a 56% no caso do Queijo Serpa Velho,

atributos que contribuem para o perfil físico-químico e sensorial característico desse queijo tradicional português (Dgadr, 2024).

2.3.2 Caracterização de Compostos Voláteis

A produção de queijo envolve uma ampla variedade de compostos voláteis, especialmente durante o processo de maturação. Essas substâncias resultam do metabolismo da lactose residual, da lipólise (metabolismo de ácidos graxos), da proteólise e do catabolismo de aminoácidos, contribuindo para a formação de álcoois, aldeídos e ésteres, que desempenham papel fundamental no aroma característico do produto (Macedo *et al.*, 2025).

O sabor é um parâmetro essencial, pois influencia diretamente a percepção e a aceitação dos consumidores. Ele está relacionado à combinação de compostos voláteis e não voláteis, formados durante o processamento do queijo. Fatores como a carga microbiana, o pH, o teor de gordura, entre outros, afetam essa percepção. A sensação olfativa, por sua vez, é desencadeada por compostos voláteis aromáticos (AVCs), que interagem com receptores específicos localizados no epitélio olfatório da cavidade nasal (Macedo *et al.*, 2025). Em queijos produzidos com coagulantes vegetais como extratos de *Cynara cardunculus* a variabilidade enzimática pode influenciar a composição do extrato (Serol *et al.*, Conceição *et al.*, 2018), afetando os processos bioquímicos durante a maturação e resultado em diferenças no perfil de compostos voláteis e nas características sensoriais do produto final.

Diversos compostos voláteis são responsáveis pelo aroma característico do queijo Serpa, sendo formados principalmente durante a maturação, a partir de reações bioquímicas complexas. Esses compostos incluem ácidos carboxílicos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, fenóis, indóis e derivados sulfurados, originados por processos como a fermentação de lactose residual e o metabolismo do citrato, além da lipólise, proteólise e catabolismo de aminoácidos (Macedo *et al.*, 2025).

A ação conjunta das enzimas presentes no leite, microbiota láctica e coagulante vegetal, em especial as cardosinas provenientes do extrato de *Cynara cardunculus*., promove a hidrólise da caseína e a liberação de aminoácidos e peptídeos, os quais resultam na formação de compostos voláteis com impacto direto na percepção sensorial (Rampant *et al.*, 2024). A degradação de aminoácidos sulfurados, por exemplo, leva à formação de metanotiol e outros derivados com aroma intenso, enquanto a lipólise libera ácidos graxos livres, que podem dar origem a ésteres e lactonas, associados a notas doces ou frutadas (Macedo *et al.*, 2025).

No queijo Serpa, o aroma e o sabor são atributos sensoriais essenciais para a aceitação pelos consumidores. Para identificar os compostos que influenciam essas propriedades, a cromatografia gasosa (CG) é uma ferramenta analítica amplamente utilizada, pois permite a separação e identificação das substâncias voláteis presentes na matriz do queijo (Eramo *et al.*, 2024). Essa técnica opera com uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária, que pode ser líquida ou sólida. A separação ocorre com base na afinidade dos compostos por essas fases, os voláteis com menor interação com a fase estacionária são transportados mais rapidamente pelo gás de arraste, enquanto aqueles com maior afinidade demoram mais tempo para sair da coluna (Nascimento *et al.*, 2018).

Dessa forma, a CG permite avaliar o impacto do uso de diferentes extratos enzimáticos e do tempo de maturação sobre o perfil volátil do queijo. Essa abordagem contribui diretamente para a compreensão das variações que afetam a qualidade sensorial e a padronização do produto final (Caboni *et al.*, 2019).

2.3.3 Técnicas espectroscópicas

As técnicas espectroscópicas no Infravermelho Próximo (NIR) e Médio (MIR) são métodos rápidos, não destrutivos e altamente eficientes para monitorar transformações em alimentos, como aquelas que ocorrem durante a maturação de queijos (Cardoso *et al.*, 2025). Ambas se baseiam na absorção seletiva de radiação infravermelha por ligações químicas presentes na matriz alimentar, permitindo a caracterização de diversos constituintes, como proteínas, lipídios e água (Santos *et al.*, 2025).

A espectroscopia MIR permite analisar a interação das moléculas com a radiação infravermelha em número de onda específicos (4000 a 400 cm^{-1}) sendo capaz de identificar grupos funcionais relacionados a OH, C-H, C=O, C-N e N-H por meio de vibrações moleculares fundamentais, que geram bandas bem definidas e intensas na região do infravermelho médio (Silva *et al.*, 2023). Trata-se de uma técnica amplamente utilizada para caracterizar componentes químicos e acompanhar processos bioquímicos, como a proteólise, devido à sua precisão na identificação de grupos funcionais específicos (Gonçalves *et al.*, 2020).

A técnica de espectroscopia NIR é empregada para avaliar a composição química dos alimentos, incluindo produtos lácteos. Sua faixa espectral varia de 14000 a 4000 nm e possibilita análises rápidas e eficazes, sem a necessidade de preparo da amostra (Folli *et al.*, 2023). Essa técnica detecta grupos orgânicos como C-H, O-H e N-H com base em sinais

harmônicos e combinações dos modos vibracionais, gerando bandas mais largas, menos intensas e frequentemente sobrepostas (Silva *et al.*, 2022).

Enquanto o MIR permite analisar bandas fundamentais com alta especificidade para grupos funcionais, o NIR opera por sobretons e combinações vibracionais menos específicas (Nadimi e Paliwal, 2024; Fodor *et al.*, 2024). A espectroscopia NIR também se destaca por sua rápida aplicação e por ser não destrutiva, ideal para monitoramento de qualidade de alimentos (Santos *et al.*, 2025).

Um aspecto importante é que ambas as técnicas permitem a identificação de grupos funcionais associados aos principais constituintes do queijo, como proteínas, lipídios e água, sendo ferramentas valiosas na caracterização físico-química ao longo da maturação (Cardoso *et al.*, 2025; De Jesus *et al.*, 2020). A combinação dessas duas técnicas espectroscópicas (MIR e NIR) possibilita uma caracterização detalhada da fração proteica e da composição dos queijos, fornecendo informações valiosas sobre sua estrutura e evolução ao longo do tempo (De Jesus *et al.*, 2023; Tolentino *et al.*, 2023).

O uso integrado dessas técnicas é muito útil para acompanhar a qualidade do queijo ao longo da maturação, porque cada método ajuda a enxergar uma etapa diferente do processo. Enquanto as análises físico-químicas mostram como os componentes básicos vão mudando, a espectroscopia permite identificar alterações estruturais e químicas de maneira rápida. Quando essas informações são analisadas em conjunto, fica mais fácil entender como os processos de proteólise, lipólise e demais reações bioquímicas influenciam a textura, o aroma e o perfil químico final do queijo. Assim, essas técnicas não servem apenas para caracterizar o produto, mas também contribuem para a padronização e a melhoria da qualidade de queijos (Onelli *et al.*, 2025; Cardoso *et al.*, 2025).

REFERÊNCIAS

- Alavi, F., & Momen, S. (2020). *Aspartic proteases from thistle flowers: Traditional coagulants used in the modern cheese industry*. *International Dairy Journal*, 107, 104709. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104709>
- Alinaghi, M., Nilsson, D., Singh, N., Højer, A., Saed'en, K. H., & Trygg, J. (2023). **Near-infrared hyperspectral image analysis for monitoring the cheese-ripening process**. *Journal of Dairy Science*, 106, 7407–7418. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23377>
- Alvarenga, N. (2008). *Introduction of freezing technology in the production of sheep cheese* (Doctoral dissertation). Technical University of Lisbon.
- 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.2024.10615>
- Araújo-Rodrigues, H., Tavaría, F. K., Santos, M. T. P. G., Alvarenga, N., & Pintado, M. M. (2020). **A review on the microbiological and technological aspects of Serpa PDO cheese: A raw ewe's milk cheese**. *International Dairy Journal*, 100, 104561. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104561>
- Araújo-Rodrigues, H., Tavaría, F. K., Santos, M. T. P. G., Alvarenga, N., & Pintado, M. M. (2020). **A review on microbiological and technological aspects of Serpa PDO cheese: An ovine raw milk cheese**. *International Dairy Journal*, 100, 104561. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104561>
- Atasever, M., & Mazlum, H. (2024). **Biochemical processes during cheese ripening**. *Veterinary Science and Practice*, 19(3), 174–182. <https://doi.org/10.17094/vetsci.1609184>
- Bansal, V., & Veena, N. (2024). **Understanding the role of pH in cheese manufacturing: General aspects of cheese quality and safety**. *Journal of Food Science and Technology*, 61(1), 16–26. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05631-w>
- Barbosa, C. H., Andrade, M. A., Vilarinho, F., Castanheira, I., Fernando, A. L., Loizzo, M. R., & Silva, A. S. (2020). **A new look at cardoon: Exploring new uses beyond cheesemaking towards zero waste**. *Foods*, 9, 564. <https://doi.org/10.3390/foods9050564>
- Barracosa, P., Simões, I., Martins, A. P., Barros, M., & Pires, E. (2021). **Biochemical diversity of cardoon flowers (*Cynara cardunculus* L.): Predicting PDO Mediterranean cheese textures**. *Food Bioscience*, 39, 100805. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100805>

- Benheddi, W., & Hellal, A. (2019). **Technological characterization and sensory evaluation of a traditional Algerian fresh cheese clotted with *Cynara cardunculus* L. flowers and lactic acid bacteria.** *Journal of Food Science and Technology*, 56, 3431–3438. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03794-9>
- Cardoso, K. L. R., de Jesus, J. C., Darg`ere, A. F., Capela, A. P. da, Oliveira, T. de 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, Article 144466. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144466>
- Conceição, C., Martins, P., Alvarenga, N., Dias, J., Lamy, E., Garrido, L., Gomes, S., Freitas, S., Belo, A., Brás, T., Paulino, A., & Duarte, M. F. (2018). ***Cynara cardunculus*: Use in cheesemaking and pharmaceutical applications.** In N. Koca (Ed.), *Technological approaches for novel applications in dairy processing*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76530>
- Corrigan, B. M., Kilcawley, K. N., & Sheehan, J. J. (2021). **Validation of a high-performance liquid chromatography method for the quantification of primary proteolysis during cheese ripening.** *International Journal of Dairy Technology*, 74, 765–775. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12765>
- Dargère, A. F., Pinto, S. M., Abreu, L. R., Correia, L. F., Santos, D. B., Silva, J. G., Marçal, J. O., Garbossa, C. A. P., Faria, R. A. P. G., & Faria, P. B. (2023). **Artisanal Minas cheese parameters associated with regions of origin in Minas Gerais, Brazil.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 75, 395–406. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12851>
- De Jesus, J. C. de, Silva, G. J., Gonçalves, B.-H. R. F., Souza, M. R. de, 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, 2000–2011. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200100>
- 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>

Dias, J. (2022). *The use of cheese from Alentejo in Portuguese gastronomy: A travel through history*. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 29, 100579. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2022.100579>

DIREÇÃO-GERAL DE AGRICULTURA E DESENVOLVIMENTO RURAL (DGADR). Caderno de especificações do Queijo Serpa – Denominação de Origem Protegida (DOP). Lisboa: DGADR, 2011. Disponível em: <https://tradicional.dgadr.gov.pt/pt/cat/queijos-e-produtos-lacteos/237-queijo-de-serpa-dop>.

El-Aide, S. A. M., Castro-Muñoz, R., Abu-Jdayil, B., & El-Dieb, S. M. (2024).

The role of microbial coagulants on the physicochemical, proteolysis, microstructure and sensory properties of low-fat Edam cheese manufactured from ultrafiltered buffalo milk. *International Dairy Journal*, 157, 105995.

<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.105995>

Eramo, V., Modesti, M., Riggi, R., Lembo, M., Vinciguerra, V., & Botondi, R. (2024).

Preserving the aromatic profile of aged Toma Piemontese Protected Designation of Origin cheese with gaseous ozone technology: A quality assessment via solid phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry/electronic nose. *Journal of Dairy Science*, 107(12), 10537–10551. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25131>

Fodor, M., Matkovits, A., Benes, E. L., & Jókai, Z. (2024). *The role of near-infrared spectroscopy in food quality assurance: A review of the past two decades*. *Foods*, 13(21), 3501. <https://doi.org/10.3390/foods13213501>

Folgado, A., & Abranches, R. (2019). *Cardoon and the cheese industry: Biotechnological tools for the production of enzymes used in milk coagulation*. *Revista de Ciências Agrárias*, 42(3), 817–828. <https://doi.org/10.19084/rca.17565>

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2017). *Fundamentals of cheese science* (2nd ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9>

Garrido, A. L. S. P. (2017). *Efeito de três ecótipos de Cynara cardunculus L. na proteólise do queijo de Évora ao longo da maturação* (Dissertação de mestrado). Universidade de Évora, Évora, Portugal.

Ghribi, A. M., Gafsi, I. M., Blecker, C., Attia, H., Bouaziz, M. A., & Besbes, S. (2022). *Cynara cardunculus* as a potential source of milk-clotting protease: **Effects on physicochemical properties of cow's milk**. *Food Science & Nutrition*, 10, 3855–3864. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2981>

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(4), 817–827. <https://doi.org/10.3390/dairy5040059>

Gominho, J., Curt, M. D., Lourenço, A., Fernández, J., & Pereira, H. (2018). *Cynara cardunculus L. as a biomass and multi-purpose crop: A review of 30 years of research.* *Biomass and Bioenergy*, 109, 257–275. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.01.001>

Guinê, R. P. F., & Florença, S. G. (2020). *The science behind traditional products: The case of Portuguese cheeses.* *International Journal of Food Engineering*, 6(2), 45–51. <https://doi.org/10.18178/ijfe.6.2.45-51>

Khattab, A. R., Girgis, H. A., Tawfik, S. M., & Farag, M. A. (2019). **Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment.** *Trends in Food Science & Technology*, 88, 343–360. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.009>

Macedo, A., Carvalho, M. J., Mecha, E., Costa, L., Ferreira, A., Inácio, R. S., & Bronze, M. R. (2025). **Matching the sensory analysis of Serpa PDO cheese with the volatile profiles. A preliminary study.** *Foods*, 14, 1509. <https://doi.org/10.3390/foods14091509>

Mandim, F., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R., Petropoulos, S. A., & Barros, L. (2023). **The wide spectrum of industrial applications for cultivated cardoon (*Cynara cardunculus L. var. altilis* DC.): A review.** *Food Chemistry*, 423, 136275. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136275>

Margalho, L. P., Kamimura, B. A., Pimentel, T. C., Balthazar, C. F., Araujo, J. V. A., Silva, R., Conte-Junior, C. A., Raices, R. S. L., Cruz, A. G., & Sant’Ana, A. S. (2021). **A large survey of the fatty acid profile and gross composition of Brazilian artisanal cheeses.** *Journal of Food Composition and Analysis*, 101, 103955. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103955>

Martin, A. J., Revol-Junelles, A.-M., Petit, J., Gaiani, C., Salas, M. L., Nourdin, N., Khatbane, M., Costa, P. M. A., Ferrigno, S., Ebel, B., Schivi, M., Elfassy, A., Mangavel, C., & Borges, F. (2024). **Deciphering rind color heterogeneity of smear-ripened Munster cheese and its association with microbiota.** *Foods*, 13(14), 2233. <https://doi.org/10.3390/foods13142233>

- Mazorra-Manzano, M. A., Moreno-Hernández, J. M., & Ramírez-Suarez, J. C. (2018). ***Milk-clotting plant proteases for cheesemaking***. In M. G. Guevara & G. R. Dale (Eds.), *Biotechnological applications of plant proteolytic enzymes* (pp. 21–41). Springer
- Mohsin, A. Z., Norsah, E., Marzlan, A. A., Abd Rahim, M. H., & Meor Hussin, A. S. (2024). ***Exploring the applications of plant-based coagulants in cheese production: A review***. *International Dairy Journal*, 148, 105792. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105792>
- Nadimi, M., & Paliwal, J. (2024). **Recent applications of near-infrared spectroscopy in food quality analysis**. *Foods*, 13(16), 2633. <https://doi.org/10.3390/foods13162633>
- Nicosia, F. D., Puglisi, I., Pino, A., Caggia, C., & Randazzo, C. L. (2022). ***Plant milk-clotting enzymes for cheesemaking***. *Foods*, 11(6), 871. <https://doi.org/10.3390/foods11060871>
- OECD; FAO. ***OECD-FAO Agricultural Outlook 2025-2034***. OECD Publishing, Paris; FAO, Rome, 2025. Disponível em: https://www.oecd.org/en/publications/2025/07/oecd-fao-agricultural-outlook-2025-2034_3eb15914/full-report.html.
- 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>
- Pluta-Kubica, A., Najgebauer-Lejko, D., Domagała, J., Lakatošová, J., Šnirc, M., & Golian, J. (2024). ***Sensory quality, volatile compounds, and physical properties of sheep's milk cheese with herbs (*Allium ursinum* L.)***. *Molecules*, 29(24), 5999. <https://doi.org/10.3390/molecules29245999>
- Rampanti, G., Cardinali, F., De León, C. M. B., Ferrocino, I., Franciosa, I., Milanović, V., Foligni, R., Portero, L. T., Garofalo, C., Osimani, A., & Aquilanti, L. (2024). ***Onopordum platylepis* (Murb.) Murb. as a novel source of thistle rennet: First application to the manufacture of traditional Italian raw ewe's milk cheese**. *Food Research International*, 192, 114838. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114838>
- Rampanti, G., Ferrocino, I., Harasym, J., Foligni, R., Cardinali, F., Orkusz, A., Milanović, V., Franciosa, I., Garofalo, C., Mannozi, C., Mozzon, M., Osimani, A., & Aquilanti, L. (2023). ***Serra da Estrela PDO cheese: Investigation into its morpho-textural traits, microbiota, and volatilome***. *Foods*, 12(1), 169. <https://doi.org/10.3390/foods12010169>

Santos, M. T. P. G. dos, Benito, M. J., Córdoba, M. de G., Alvarenga, N., & Ruiz-Moyano, S. (2017). ***Yeast community in traditional Portuguese Serpa cheese by culture-dependent and -independent DNA approaches***. *International Journal of Food Microbiology*, 262, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.013>

Saremnezhad, S., Soltani, M., Tekin, A., Kanmaz, H., Sahingil, D., Kaya, B., Gökçe, Y., & Hayaloglu, A. A. (2024). **Influence of the blends of sheep's and goat's milk on the functional properties and volatile compounds of Lighvan cheese during ripening: A comparative study**. *Food Science & Nutrition*, 12, e4543. <https://doi.org/10.1002/fsn3.4543>

Serol, P. C. L. (2017). ***Quantitative and qualitative microbiological characterization of Serpa cheese: A preliminary study for the development of autochthonous starters*** (Master's dissertation). Instituto Politécnico de Beja, Escola Superior Agrária, Beja, Portugal.

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**. Discrimination of Coalho cheese origin. *International Journal of Dairy Technology*, 74, 393–403. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12767>

Silva, L. K. R., De Jesus, J. C., Onelli, R. R. V., Conceição, D. G., Santos, L. S., & Ferrão, S. P. B. (2023). **Spectroscopy (MIR), chromatography (RP-HPLC) and chemometrics applied to soluble peptides to discriminate the geographic origin of coalho cheese**. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 50, Article 102678. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102678>

Silva, L. K. R., Santos, L. S., & Ferrão, S. P. B. (2022). **Application of infrared spectroscopic techniques to cheese authentication: A review**. *International Journal of Dairy Technology*, 75, 490–512. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12859>

Tabet, R., Mechai, A., Branes, Z., & Chenchouni, H. (2023). **Effect of vegetable coagulant and lamb rennet on physicochemical composition, fatty acid profile and lipid quality indices of a traditional fresh cheese (Jben)**. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 47, 102609. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102609>

Teixeira, J. L. da P., Caramês, E. T. dos S., Baptista, D. P., Gigante, M. L., & Pallone, J. A. L. (2021). **Rapid adulteration detection of yogurt and cheese made from goat milk by vibrational spectroscopy and chemometric tools**. *Journal of Food Composition and Analysis*, 96, 103712. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103712>

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, Foreign Agricultural Service (USDA FAS). ***Production – Cheese*** (*Commodity Code: 0240000*). Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/production/commodity/0240000>

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de diferentes perfis enzimáticos obtidos de cardo (*Cynara cardunculus*) nas propriedades do queijo Serpa, considerando a composição físico-química, e os perfis proteolíticos, de compostos voláteis, espectroscópico, ao longo do tempo de maturação.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar a composição química e física dos queijos Serpa produzidos com extratos enzimáticos obtidos de cardo (*Cynara cardunculus*) com diferentes perfis enzimáticos maturados por 30, 60, 90 e 120 dias;
- Avaliar os processos de proteólise e lipólise durante os diferentes períodos de maturação dos queijos;
- Identificar os peptídeos formados ao longo da maturação por meio da cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-RP);
- Analisar o perfil de compostos voláteis dos queijos utilizando cromatografia gasosa (GC);
- Obter perfil espectroscópico por infravermelho médio (MIR) e próximo (NIR), avaliando as variações associadas aos cardos (*Cynara cardunculus*) com diferentes perfis enzimáticos e ao tempo de maturação;
- Comparar as características finais do queijo Serpa após o período de maturação, a fim de verificar diferenças entre os tratamentos.

CAPÍTULO III

INFLUÊNCIA DE DOIS TIPOS DE CARDO (*CYNARA CARDUNCULUS*)
NA MATURAÇÃO DO QUEIJO SERPA POR MEIO DAS PROPRIEDADES
ESPECTROSCÓPICAS E PERFIL VOLÁTIL DOS QUEIJOS

Renata de Souza da Rocha, Arthur Pompilio da Capela, Cleidiane Pereira da Silva dos Santos, Josane Cardim de Jesus, Cristina Maria dos Santos Conceição, Sibelli Passini Barbosa Ferrão

RESUMO

O queijo Serpa é um queijo tradicional português produzido com leite cru de ovelha e coagulado com enzimas vegetais de *Cynara cardunculus*, cuja atividade proteolítica varia conforme o perfil enzimático. Este estudo avaliou o efeito de cardos com diferentes perfis enzimáticos nas características do queijo ao longo da maturação. Os queijos foram produzidos com dois cardos, C1 (sem cardosina A) e C2 (com cardosina A), e analisados aos 30, 60, 90 e 120 dias. Foram avaliadas a composição química, propriedades físicas e frações de nitrogênio, além de espectros de infravermelho próximo (NIR) e médio (MIR) e perfis peptídicos e de compostos voláteis. Cloretos, gordura e elasticidade apresentaram comportamento linear, enquanto umidade, atividade de água, adesividade e L^* exibiram variações não lineares. A lipólise e a coordenada a^* diferiram entre os tratamentos. As análises espectroscópicas evidenciaram alterações associadas à água, lipídios e proteínas, influenciadas pelo tempo e pelo coagulante, com maior intensidade em C1 e comportamento distinto em C2. A ACP indicou separação entre os tratamentos, principalmente nos estágios iniciais. Os perfis de peptídeos mostraram acúmulo de frações mais hidrofóbicas em C1 e maior liberação inicial em C2. Os compostos voláteis evoluíram ao longo da maturação, com predominância de álcoois e ácidos graxos nos estágios iniciais e maior complexidade em períodos avançados. Os resultados demonstram que o perfil enzimático do cardo influencia as transformações bioquímicas e estruturais do queijo Serpa, com destaque para o tratamento C2, que apresentou melhor desempenho nos parâmetros avaliados.

Palavras Chave: Coagulante Vegetal; Lipólise; Proteólise

1 INTRODUÇÃO

Os queijos tradicionais de ovelha possuem grande importância sensorial, gastronômica e cultural, sendo produzidos há gerações. Entre eles, destaca-se o queijo Serpa, que tem denominação de origem protegida (DOP) e é fabricado em uma área específica do Baixo Alentejo, conforme o Decreto Regulamentar n.º 39/87. Nos primeiros dias de maturação, esse queijo apresenta uma crosta fina e flexível, com interior cremoso e textura amanteigada, além de sabor e aroma intensos característicos da variedade (Alvarenga *et al.*, 2025).

Características sensoriais estão associadas a utilização o do leite cru de ovelha e do extrato aquoso das flores do cardo (*Cynara cardunculus*), planta típica da região mediterrânea, que contém proteases aspárticas, responsáveis pela coagulação do leite (Alvarenga *et al.*, 2025). A coagulação ocorre pela ação das proteases aspárticas, principalmente as cardosinas A e B, que atuam na clivagem da κ -caseína, permitindo a formação do gel (De Jesus *et al.*, 2024).

Essas proteases também influenciam nas transformações proteolíticas que ocorrem durante a maturação. Maturação é uma etapa fundamental para o desenvolvimento da identidade sensorial do queijo, pois envolve um conjunto de transformações bioquímicas e físicas que se refletem na textura, cor e perfil aromático do queijo (Atasever & Mazlum, 2024). Essas transformações resultam na liberação de peptídeos e aminoácidos, que atuam como precursores de compostos voláteis, estando diretamente relacionados à composição química e à atividade enzimática do extrato de cardo, participando de reações bioquímicas produzindo compostos que são associados ao aroma do queijo (Macedo *et al.*, 2025).

Dessa forma, a formação dos compostos voláteis ao longo da maturação está vinculada principalmente às reações de lipólise e proteólise, responsáveis pela geração de diferentes compostos, como ácidos carboxílicos, álcoois, aldeídos, cetonas e ésteres, que contribuem para o aroma característico do queijo Serpa (Macedo *et al.*, 2025). Transformações bioquímicas também se refletem nos grupos funcionais presentes na composição da matriz do queijo, como O–H, C–H, C=O, N–H e C–O, os quais estão relacionados às interações entre água, lipídios e proteínas durante a maturação (Santos *et al.*, 2025; De Jesus *et al.*, 2020). Assim, a análise conjunta do perfil de compostos voláteis e dos grupos funcionais permite compreender melhor as transformações químicas e estruturais que ocorrem no queijo Serpa ao longo do processo de maturação.

Esses parâmetros podem variar entre cardos de regiões diferentes em função de fatores genéticos e da própria diversidade natural da espécie, refletindo-se em diferenças nos parâmetros sensoriais, estruturais, físicos e químicos do queijo (Barracosa *et al.*, 2021). Diante disso, o extrato coagulante é importante nesse processo, considerando que diferentes perfis enzimáticos do cardo (*Cynara cardunculus*) podem influenciar a composição e as transformações químicas e estruturais ao longo da maturação.

Dentre as enzimas presentes no extrato de cardo, destacam-se as cardosinas A e B, proteases responsáveis pela coagulação do leite. Essas enzimas apresentam diferentes especificidades de clivagem sobre as frações de caseína, o que influencia diretamente o processo de formação do gel (Conceição *et al.*, 2018; Alvarenga *et al.*, 2025). Essas variações refletem-se nas transformações que ocorrem durante a maturação, afetando reações como a proteólise e a lipólise, que podem ser intensificadas ou reduzidas conforme a variabilidade enzimática do extrato de cardo (Conceição *et al.*, 2018; Gomes *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, técnicas analíticas como a espectroscopia no infravermelho médio (MIR) e próximo (NIR), e técnicas cromatográficas, têm sido amplamente incorporadas aos estudos de queijos com o objetivo de permitir análises mais completas. A espectroscopia MIR e NIR possibilita identificar grupos funcionais de forma rápida e sem uso de reagentes químicos, principalmente quando combinada com métodos quimiométricos, como a Análise de Componentes Principais (ACP) (Santos *et al.*, 2025). Além disso, técnicas como a cromatografia líquida em fase reversa (RP-HPLC) e a cromatografia gasosa (GC) têm sido usadas para separar e quantificar peptídeos e para identificar compostos voláteis relacionados ao aroma e à maturação (Saremnezhad *et al.*, 2024).

Considerando a variabilidade enzimática de cardos (*Cynara cardunculus*) e sua influência na composição e nas transformações químicas e estruturais durante a maturação de queijo, Objetivou-se avaliar o efeito de extratos de cardo com diferentes perfis enzimáticos nas transformações bioquímicas e nas características estruturais e aromáticas do queijo serpa ao longo do tempo de maturação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do extrato e preparação do queijo

Dois lotes comerciais de flores de cardo (*Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris*), provenientes de plantas cultivadas na região do Baixo Alentejo tiveram os pistilos separados da estrutura floral e submetidos à secagem por 30 dias a 23 °C, em local protegido da luz solar direta (Gomes et al., 2019; Alvarenga et al., 2025). Em seguida foram previamente caracterizados quanto ao perfil enzimático por eletroforese em gel de poliacrilamida com ureia (Urea-PAGE), o que permitiu distinguir os lotes com base na presença ou ausência de cardosina A, segundo Barracosa et al. (2021), possibilitando a comparação entre os extratos, que foram classificados em C1 (sem cardosina A) e C2 (com cardosina A).

Os extratos coagulantes foram preparados separadamente, a partir de cada tratamento (C1 e C2) previamente caracterizados. 4 kg de pistilos florais secos de cada tratamento foram macerados manualmente em almofariz, a 40 L de água, mantendo-se a proporção de 1:10 (m/v). A extração foi realizada à temperatura ambiente (20 -25 °C), e os extratos foram posteriormente armazenados a 3 °C até o momento da utilização.

Os queijos foram produzidos utilizando leite cru de ovelha da raça Merina Branca. Foram realizadas duas produções independentes, cada uma utilizando 1.000L de leite, correspondentes aos tratamentos C1 e C2. O processo de fabricação teve início com a filtração do leite, seguida do aquecimento até 30 °C (± 1 °C) em tanque de parede dupla. Para a coagulação, foi adicionado o extrato de cardo na proporção de 2,2 L de extrato para 1.000 L de leite, mantendo-se a mistura em repouso por 45 a 60 minutos. Em seguida, realizou-se a salga com cloreto de sódio (NaCl), na proporção de 21 g/L de leite. Após o período de coagulação, o coágulo foi cortado e, após 15 minutos, procedeu-se à drenagem do soro. A coalhada foi então transferida para moldes cilíndricos (12 cm de diâmetro $\times$ 7 cm de altura), conforme disposto no Caderno de Especificações do Queijo Serpa DOP.

Nessa etapa inicial, os queijos permaneceram enformados por aproximadamente oito horas, sendo posteriormente transferidos para a primeira câmara de maturação, onde foram envolvidos em tecido de algodão e mantidos por 15 dias a 8–9 °C e 92–97 % de umidade relativa. Após este período os queijos foram transferidos para uma segunda câmara de maturação, ajustada para 14 °C e 79 % de umidade relativa, onde permaneceram até completar 120 dias de maturação. Amostras foram analisadas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 dias, quando foram retiradas da câmara para cada tempo correspondente e imediatamente

congeladas a -18 ± 1 °C, com o objetivo de interromper as reações bioquímicas associadas à maturação.

2.2 Composição química e análises físicas e bioquímicas

Todas as análises foram realizadas em triplicata, seguindo as metodologias descritas pela AOAC (2005). O miolo dos queijos foi previamente separado da casca e triturado com auxílio de um Mixer Turbo Chef 3 em 1 (200 W, Elgin), até a obtenção de uma massa homogênea, reservada para a realização das análises. Foram determinados os teores de umidade segundo o método (AOAC 935.42), cinzas (AOAC 926.08), (AOAC 983.14), (AOAC 920.124), proteína total determinada pelo método de Kjeldahl, utilizando fator de conversão 6,38 (AOAC 2001.14), e acidez titulável conforme metodologia oficial da AOAC (2019). O pH foi determinado com o auxílio de um medidor digital (Kasvi-Modelo K39-201). A atividade de água (A_w) foi determinada utilizando um medidor de atividade de água AquaLab (Decagon Devices Inc., EUA).

As análises de perfil de textura (TPA) foram realizadas em seis repetições, utilizando o analisador de textura TA.HD Plus (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido). As amostras com dimensões de 25 mm de altura por 20 mm de diâmetro foram submetidas à compressão dupla por meio de uma placa de aço inoxidável de 100 mm. Os ensaios foram realizados com velocidade de deformação de 1,0 mm/s e compressão máxima de 10 mm. A configuração experimental e o registro dos dados foram realizados por meio do software Texture Expert for Windows 1.20 (Stable Micro Systems, UK). Para a análise dos parâmetros de dureza, elasticidade e coesividade, utilizou-se o programa Brookfield Texture Pro CT V1.4, conforme metodologia descrita por Jesus *et al.* (2024).

A cor das amostras foi determinada instrumentalmente por meio da medição direta dos parâmetros L^* , a^* e b^* no sistema CIELAB, utilizando um espectrofotômetro ColorQuest XE (HunterLab, Reston, EUA). Para cada amostra, porções de 10 a 20g do interior do queijo foram cortadas e posicionadas diretamente na abertura de leitura do equipamento, realizando-se cinco leituras por amostra, conforme metodologia descrita por Pathare *et al.* (2013).

2.3 Proteólise

A proteólise foi realizada conforme o método descrito por Wolfschoon-Pombo e De Lima (1989). Foram pesados 10 g de queijo e transferidos para um dispersor Ultra-Turrax T18 basic (IKA, Staufen, Alemanha), realizando-se a homogeneização a 11.000 rpm por 10

minutos. Em seguida, adicionou 80 mL de água destilada a 45 °C e 40 mL de solução de citrato de sódio 0,50 M (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO EUA). A mistura foi novamente homogeneizada em homogeneizador de alta rotação Ultra-Turrax T18 basic (IKA, Staufen, Alemanha) por 7 minutos e posteriormente filtrada em papel de filtro Whatman nº 42. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 200 mL e completada com água destilada até o menisco (solução A). A partir dessa solução, retiraram-se alíquotas de 5 mL para determinação do nitrogênio total pelo método de Kjeldahl (AOAC 2001.14).

Para a determinação do nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético a 12%, foram retirados 50 mL da solução A, transferidos para um béquer de 100 mL e misturados com 50 mL de solução de TCA 24% (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO). A mistura permaneceu em repouso por 15 minutos e foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 42. Em seguida, 5 mL do filtrado foram coletados para digestão pelo método de Kjeldahl (AOAC 2001.14).

Para a determinação do nitrogênio solúvel em pH 4,6, transferiu-se 100 mL da solução A para um béquer de 250 mL. Adicionaram-se 10 mL de HCl 1,4 M (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO EUA) e 15 mL de água destilada. O pH da solução foi medido e ajustado para 4,6 utilizando-se hidróxido de sódio 0,1 M (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO EUA). A solução final foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 42, e 5 mL do filtrado foram coletados para digestão pelo método de Kjeldahl (AOAC 2001.14).

2.4 Lipólise

A lipólise, expressa pelo teor total de ácidos graxos livres (% AGL), foi determinada conforme o método descrito por Kondyli *et al.* (2023). Inicialmente, 5 mL de água destilada aquecida (45 °C) foram adicionados a 3,0 g da amostra e misturados até a formação de uma pasta. Em seguida foram adicionados 10 mL de isopropanol (Ecibra, Santo Amaro, São Paulo, Brasil), éter de petróleo (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) e ácido sulfúrico 4 N (Êxodo Científica, Sumaré, São Paulo, Brasil), na proporção de 40:10:1 (v/v). Após essa etapa, 6 mL de éter de petróleo (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) foram adicionados e a mistura foi submetida à agitação. Após 5–10 minutos de repouso, observaram-se duas fases, sendo a fase superior coletada para titulação com solução metanólica de KOH 0,02 N (Digilab, Piracicaba, São Paulo), utilizando fenolftaleína 1% (CheeseLab, Ipiranga, São Paulo) como indicador. Os resultados foram expressos em percentual de ácido palmítico (Collins; McSweeney e Wilkinson, 2003).

2.5 Análise Espectroscópica por Infravermelho Médio (MIR)

Para a análise espectroscópica, aproximadamente 0,5 g de cada amostra foi utilizada. Os espectros de infravermelho foram obtidos por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier, acoplada a acessório de Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR), em espectrômetro Cary® 630 FTIR (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). As aquisições foram realizadas no intervalo de 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , totalizando 64 varreduras por análise. As medições foram realizadas no modo de absorbância utilizando cristal de diamante, sob temperatura ambiente controlada (25 ± 1 °C). Antes de cada coleta, o espectro de fundo branco foi verificado. O software utilizado para aquisição dos espectros foi o Agilent MicroLab PC.

2.6 Análise Espectroscópica por Infravermelho Próximo (NIR)

As amostras foram analisadas em um espectrofotômetro SpectraStar 2500XL (Unity Scientific, Brookfield, CT, USA), equipado com lâmpada de halogênio de tungstênio como fonte de luz e detector de arseneto de índio-gálio (InGaAs). Em seguida, as amostras foram dispostas de modo a preencher completamente o fundo do copo de quartzo. Os espectros foram obtidos no modo de refletância (%R) e posteriormente convertidos para absorbância por meio da transformação $\log(1/R)$. As digitalizações foram realizadas no intervalo espectral de 1100 a 2500 nm, com resolução de 1 nm e 64 varreduras por leitura. O software Unity InfoStar V3.11.3 foi utilizado para a configuração, controle e aquisição dos dados do espectrômetro.

2.7 Extração de peptídeos solúveis em água (PSA)

A extração de peptídeos foi feita de acordo com De Jesus *et al.* (2024). Foram pesados 10 g do miolo dos queijos e misturados com 50 mL de água Milli-Q (Merck-Millipore, Bedford, MA), em um homogeneizador (Quimis, Diadema, SP, Brasil) a 200 rpm por 1 h. Em seguida, os extratos foram filtrados em papel de filtro Whatman nº 41 e, logo após, centrifugados a 4000 g e 4 °C (Sorvall, Newtown, CT, EUA), repetindo esse processo três vezes. O filtrado foi liofilizado (Liofilizador Alpha 1-2 LD plus Christ) por 24 horas e congelado a -18 °C até a análise.

2.8 Perfil cromatográfico dos PSA

O perfil cromatográfico dos PSA foi obtido por cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC), seguindo a metodologia proposta por De Jesus *et al.* (2024), com adaptações. Utilizou-se um sistema HP Agilent 1260 Infinity II equipado com uma pré-coluna ZORBAX SB-C18 (4,6 mm × 12,5 mm, 5 µm) e uma coluna analítica ZORBAX Eclipse Plus C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm). O procedimento empregou duas fases móveis: a fase A consistiu em acetonitrila a 5% (v/v) contendo 0,1% (v/v) de TFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), enquanto a fase B foi preparada com acetonitrila a 50% (v/v) e TFA a 0,1% (v/v). Para análise, 100 mg do PSA liofilizado foram solubilizados em 1 mL da solução de acetonitrila a 5% com TFA. Em seguida, 20 µL da amostra foram automaticamente injetados na coluna, operando a 1 mL min⁻¹, sob um gradiente linear que partiu de 100% da fase A durante 60 minutos até atingir 100% da fase B. A temperatura do sistema foi mantida a 30 °C e a detecção dos peptídeos solúveis em água ocorreu a 215 nm utilizando um detector UV-Vis.

2.9 Cromatografia Gasosa (GC)

Para a análise dos compostos voláteis, cerca de 5 g do miolo de cada queijo foram fragmentados em cubos de aproximadamente 3–5 mm e acondicionados em frascos de vidro âmbar de 20 mL (Dargère et al., 2023). A extração dos compostos voláteis foi realizada por microextração em fase sólida (SPME), utilizando uma fibra de divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) com espessura de filme de 50/30 µm. As amostras foram incubadas a 60 °C por 10 minutos e, em seguida, a fibra foi automaticamente exposta ao espaço de cabeça dos frascos por 30 minutos para adsorção dos voláteis presentes no espaço de cabeça dos frascos. Após a extração, a fibra foi imediatamente inserida no injetor do cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (GC/MS-QP2010, Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com um injetor automático (AOC-5000, Shimadzu, Kyoto, Japão), operando em modo splitless a 250 °C. A separação dos compostos foi realizada em uma coluna capilar SLB-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Supelco), com temperatura inicial de 40 °C e final de 230 °C. O gás hélio foi utilizado como fase móvel, com fluxo constante de 2 mL/min. A identificação dos compostos foi realizada com base nos espectros de massas obtidos, por meio da comparação com a biblioteca do software GCsolution (NIST, 2020). Também foram utilizados os índices de retenção (índice de Kovats), determinados experimentalmente, e comparados com valores de referência descritos na literatura (Adams, 2007). Os resultados foram expressos como percentuais da

área relativa de cada composto identificado em relação ao total de compostos voláteis detectados.

2.10 Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2×4 (dois cardos com perfis enzimáticos diferentes $\times$ quatro tempos de maturação: 30, 60, 90 e 120 dias). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), considerando os efeitos dos cardos, dos períodos de maturação e da interação entre esses fatores, utilizando o software SAS (Statistical Analysis System), versão 9.1 para estudantes.

Quando observada interação significativa, foram realizadas análises adicionais para investigar os efeitos simples de cada fator. Em seguida, aplicou-se regressão fatorial para cada ecótipo de cardo, adotando nível de significância de 5%, com o objetivo de avaliar os efeitos lineares e quadráticos do tempo sobre as características dos queijos.

Para investigar padrões de similaridade e distinção entre os queijos ao longo da maturação, foi aplicada a análise de componentes principais (ACP) aos dados espectrais de MIR e NIR, dados de cromatografia gasosa, utilizando compostos voláteis selecionados com base na recorrência, representatividade das classes químicas e áreas relativas, agrupados por classe química. utilizando o software Origin 2021 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA).

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Análises físicas e químicas

Verificou-se que os parâmetros físico-químicos dos queijos Serpa foram influenciados pelo tipo de coagulante (C1 e C2) quanto pelo período de maturação, conforme descrito pelos modelos de regressão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1. Modelos de regressão para os atributos físico-químico de queijos produzidos com dois cardos com diferentes perfis enzimáticos em função do tempo de maturação.

		Equação	R²
Umidade (%)	C1	$57.13583333-0.69807222x+0.00262500x^2$	0.974868
	C2	$69.83583333-1.29521667x+0.00691204x^2$	0.881357
Cinzas (%)	C1	$\hat{Y}=\bar{Y}$	**
	C2	$\hat{Y}=\bar{Y}$	**
Cloreto	C1	$2.416666667+0.036233333x$	0.763054
	C2	$3.835000000+0.021866667x$	0.621759
Gordura (%)	C1	$22.64500000+0.18645556x$	0.963298
	C2	$29.03666667+0.11543333x$	0.876752
aw	C1	$0.9755833333-.0003438889x-.0000165741x^2$	0.948231
	C1	$1.152416667-0.008533889x+0.000042870x^2$	0.706399
Acidez (%)	C1	$0.9916666667+0.0074333333x$	0.940067
	C2	$1.570000000+0.006922222x$	0.939837
pH	C1	$\hat{Y}=\bar{Y}$	**
	C2	$\hat{Y}=\bar{Y}$	**
ProteínaTotal (%)	C1	$\hat{Y}=\bar{Y}$	**
	C2	$\hat{Y}=\bar{Y}$	**
IEP (%)	C1	$\hat{Y}=\bar{Y}$	**
	C2	$\hat{Y}=\bar{Y}$	**
IPP (%)	C1	$\hat{Y}=\bar{Y}$	**
	C2	$\hat{Y}=\bar{Y}$	**
Lipolise	C1	$\hat{Y}=\bar{Y}$	**
	C2	$0.8066666667+ 0.0091777778x$	0.955007
L*	C1	$91.77166667-0.48558889x+0.00238704x^2$	0.746033
	C2	$110.2175000-1.2501833x+0.0076176x^2$	0.759745
a*	C1	$30.57000000-0.17665556x+ 0.00149444x^2$	0.881935
	C2	$\hat{Y}=\bar{Y}$	**

b*	C1	$(-1.479166667)+0.005350000x+0.000158333x^2$	0.898657
	C2	$(-3.675000000)+0.120222222x+0.000588889x^2$	0.581952
Adesividade	C1	$(-0329856737)-0.0221944514x+0.0001675306x^2$	0.555219
	C2	$(-2.148493942)+0.047899309x-0.000281328x^2$	0.946203
Elasticidade (mm)	C1	$2.309397590+0.023274074x$	0.748858
	C2	$4.040696118+0.014037126x$	0.753003
Coesividade	C1	$\hat{Y}=\bar{Y}$	**
	C2	$\hat{Y}=\bar{Y}$	**
Dureza (N)	C1	$\hat{Y}=\bar{Y}$	**
	C2	$\hat{Y}=\bar{Y}$	**

IEP: índice de extensão da proteólise; IPP: índice de profundidade da proteólise; ** = não significativo

Observou-se que o uso de coagulante com perfis enzimáticos diferentes influenciou significativamente os atributos analisados, resultando em modelos lineares, quadráticos ou ausência de ajuste. Para os parâmetros cloreto, gordura, acidez e elasticidade obteve-se ajuste linear ($p \leq 0,05$) crescente, indicando que esses parâmetros variaram de forma contínua durante a maturação, isso permite maior controle do processo de maturação e da padronização do produto final. Além disso, esse comportamento está associado à perda progressiva de umidade, concentração de sólidos e intensificação da proteólise, que afetam especialmente a acidez que é resultante da degradação da lactose pela microbiota (cultura starter ou microflora natural), gerando ácido lático e outros ácidos orgânicos (Fox *et al.*, 2017).

Entretanto, a umidade, a atividade de água (a_w), a luminosidade (L^*), a coordenada amarelo/azul (b^*) e a adesividade apresentaram ajuste quadrático, indicando ausência de linearidade ao longo da maturação. De modo geral, a umidade e a luminosidade apresentaram redução inicial seguida de aumento, enquanto a atividade de água apresentou redução contínua ou comportamento quadrático, dependendo do tratamento. Para a adesividade, observaram-se tendências distintas entre os tratamentos, com redução seguida de aumento em um e aumento seguido de redução no outro, evidenciando a influência do perfil enzimático do coagulante na propriedade avaliada. Esse comportamento pode estar relacionado à maior intensidade inicial de perda de água, seguida por uma etapa de estabilização condicionada pela atividade enzimática e pela evolução físico-química da matriz (Silva *et al.*, 2023; Cai *et al.*, 2023; Sanahuja *et al.*, 2023).

Por outro lado, os atributos pH, proteína total, índice de extensão da proteólise (IEP), índice de profundidade da proteólise (IPP), dureza e coesividade apresentaram falta de ajuste aos modelos testados ($p \geq 0,05$). Isso indica que a regressão não conseguiu identificar

adequadamente a variação desses parâmetros, provavelmente devido a variações na matriz proteica ou bioquímicas não lineares. Pereira *et al.*, 2020 e Inácio *et al.*, 2025 relatam que parâmetros como dureza, coesividade, bem como parâmetros proteolíticos, podem apresentar comportamento irregular e difícil de modelar em função do tempo, devido à heterogeneidade da matriz e à sensibilidade desses atributos a pequenas variações na composição.

Destaca-se ainda que os parâmetros de lipólise e coordenada a^* apresentaram comportamentos distintos entre os cardos analisados. Para a lipólise, C1 apresentou falta de ajuste, enquanto C2 ajustou-se ao modelo linear crescente, indicando que a liberação de ácidos graxos livres foi mais progressiva e controlada durante a maturação do queijo elaborado com C2. Já para o parâmetro a^* , C1 ajustou-se a um modelo quadrático com uma redução inicial seguida de um aumento ao longo da maturação, sugerindo variação na tonalidade avermelhada ao longo da maturação, enquanto C2 apresentou falta de ajuste, indicando comportamento imprevisível da cor. Diferenças similares entre cardos de *Cynara cardunculus* já foram descritas, atribuídas à variação na composição e atividade das cardosinas, que influenciam diretamente a hidrólise lipídica e a evolução da cor (Correia *et al.*, 2016; Gomes *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2021).

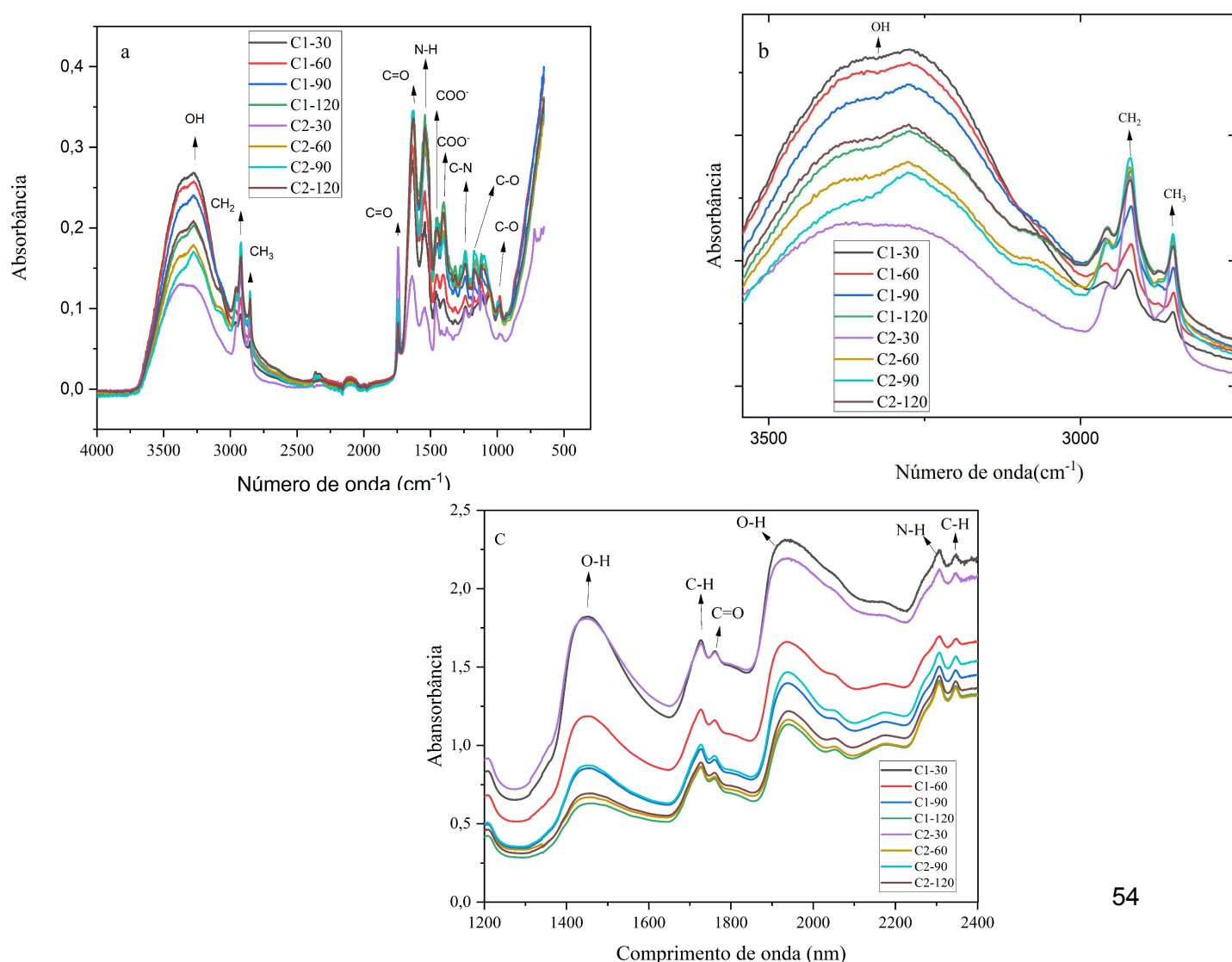
3.2 Espectroscopia no Infravermelho Médio (MIR) e próximo (NIR)

A caracterização espectroscópica dos queijos produzidos a partir de coagulantes com diferentes perfis enzimáticos foi realizada nas regiões do infravermelho médio (MIR) e do infravermelho próximo (NIR), cujos perfis estão apresentados na figura 1.

O perfil espectroscópico dos queijos produzidos com diferentes perfis enzimáticos de coagulantes foram analisados por MIR e NIR (Figura 1). A partir dos espectros obtidos foi possível identificar 11 bandas para MIR, com a primeira banda espectral correspondente ao estiramento O–H em torno de 3270 cm^{-1} (Figura 1a), característico de grupos hidroxila presentes em carboidratos e água do queijo (Cardoso *et al.*, 2025). Na mesma região, as bandas em 2951 e 2850 cm^{-1} refletem os estiramentos simétricos e assimétricos de CH_2 e CH_3 , típicos de cadeias alifáticas, indicando a presença de alcanos e grupos alquila associados aos ácidos graxos da matriz lipídica. A porção lipídica também se manifesta pelo sinal do grupo carboxila (C=O) e pelos estiramentos C–O, marcadores importantes de ésteres e ácidos graxos. Além disso, observou-se bandas atribuídas às ligações C–N e ao estiramento de amida, características das proteínas lácteas, evidenciando a contribuição da fração proteica para o perfil espectral (De Jesus *et al.*, 2025).

Foi possível observar nos espectros MIR que a utilização de dois coagulantes com perfis enzimáticos distintos resultou em diferenças expressivas na intensidade de absorção ao longo do tempo de maturação. Nota-se que a intensidade e comportamento de absorção entre os tratamentos foi distinta, sendo que, conforme evidenciado na Figura 1b, os queijos produzidos com o coagulante C1 apresentaram maiores intensidade de absorbância ao longo do período de maturação e um comportamento crescente bem definido de 30,60,90 e 120 dias de maturação, especialmente nas regiões associadas às bandas O–H e às de CH₂ e CH₃. Entretanto para o coagulante C2, observou-se um comportamento diferente, no qual a maior intensidade de absorbância ocorre aos 120 de maturação, seguidos dos tempos de 60,90 e 30 dias, demonstrando que não ocorre um comportamento linear e que o coagulante C2 influencia de forma diferente as reações químicas e bioquímicas do queijo ao longo da maturação.

Figura 1 – Espectros de queijos produzidos com extratos de cardos com perfis enzimáticos diferentes e maturados por 30, 60, 90 e 120 dias: (a) espectros obtidos por MIR; (b) espectros obtidos por MIR ampliado; (c) espectros obtidos por NIR.

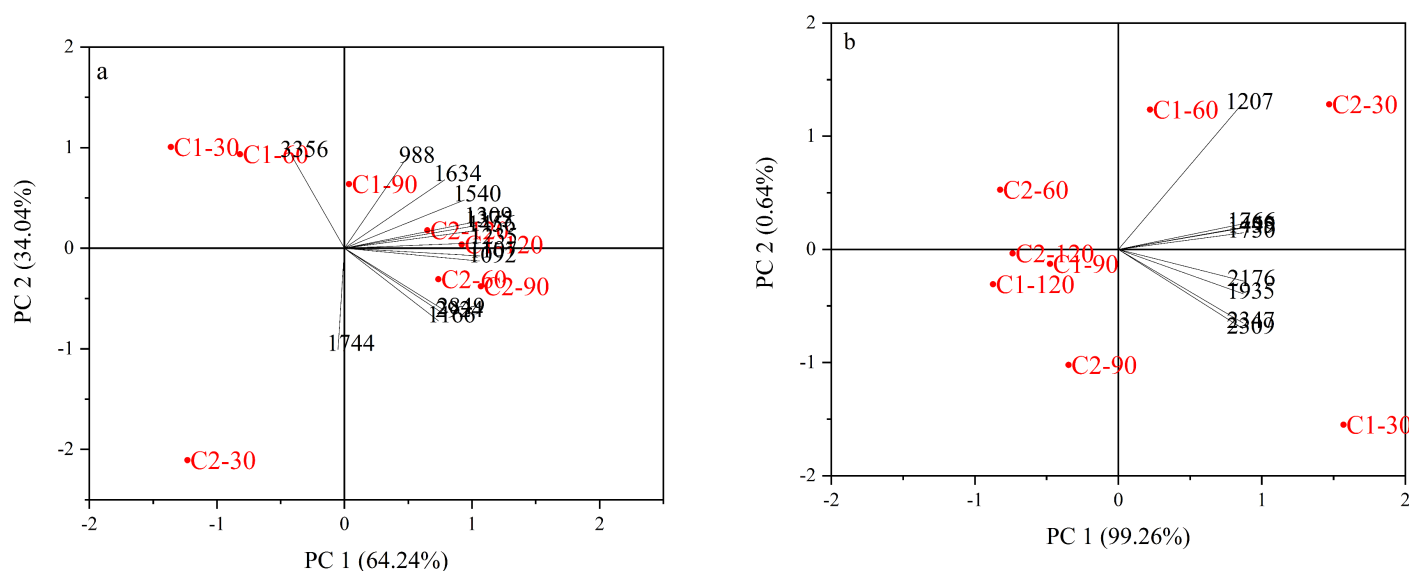


Os espectros obtidos por NIR (Figura 1c) apresentaram bandas largas e com variações de intensidade entre as amostras. Novamente foi possível perceber que a intensidade e o comportamento entre os coagulantes foram distintos, demonstrando que o coagulante C2 apresenta maior intensidade aos 120 dias seguidos do tempo 60.

A faixa espectral permitiu identificar 6 bandas, e entre as regiões de maior destaque nota-se que as bandas em 1450 a 1600 nm correspondem, respectivamente, à combinação dos modos de estiramento do grupo O–H, estando diretamente relacionadas ao teor de água presente nas amostras (Medeiros *et al.*, 2023). A banda marcada como C=O, situada logo abaixo de 1700 nm, corresponde a combinações envolvendo a carbonila dos triglicerídeos e das ligações peptídicas, sendo uma região sensível tanto à matriz lipídica quanto à estrutura proteica (Cardoso *et al.*, 2025). Os grupos funcionais N-H associados às proteínas, aparecem nas bandas próximas de 2100–2200 nm, correspondentes às combinações e sobretons das vibrações N–H das amidas (Silva *et al.*, 2023).

A partir dos espectros MIR e NIR foi possível identificar diversas bandas associadas a grupos funcionais relacionados à água, proteínas e lipídios, cujas intensidades e comportamento variaram em função do tempo de maturação e do tratamento aplicado. Considerando essa variação espectral, a Análise de Componentes Principais (ACP) foi empregada como ferramenta exploratória, com o objetivo de avaliar de forma conjunta a influência dos diferentes extratos de cardo e da maturação no agrupamento das amostras.

Figura 2 - Dispersão dos Componentes Principais obtida por espectroscopia no infravermelho médio (MIR) e próximo (NIR) de queijos produzidos com extratos de cardos com perfis enzimáticos distintos e maturados por 30, 60, 90 e 120 dias: (a) bandas espectrais MIR; (b) bandas espectrais NIR.



Na Figura 2a os dois componentes principais (CP) explicaram 98,28% da variância total dos dados sendo a PC1 responsável por 64,24% da variância enquanto a CP2 explicou 34,04%. A CP1 apresentou correlação positiva com todas as bandas analisadas, associadas aos grupos de (CH₂) (CH₃) (C=O) (N-H) (C-N) e (C-O), com exceção do grupo (O-H) que demonstrou relação negativa com a CP2, indicando que, especialmente aos 30 dias de maturação, os queijos produzidos com os cardos C1 e C2 apresentaram diferenças na organização da matriz, associadas principalmente ao teor de água e às frações lipídicas, comportamento semelhante foi visto na tabela Tabela 2.

O tratamento C1 apresentou um comportamento mais linear entre os tempos (30,60,90 e 120) e ordenado ao longo da maturação, enquanto C2 mostrou maior dispersão, sobretudo nos períodos de 120 e 60 dias, sugerindo maior variabilidade associada às interações entre água, lipídeos e proteínas induzida por este tratamento nesses períodos.

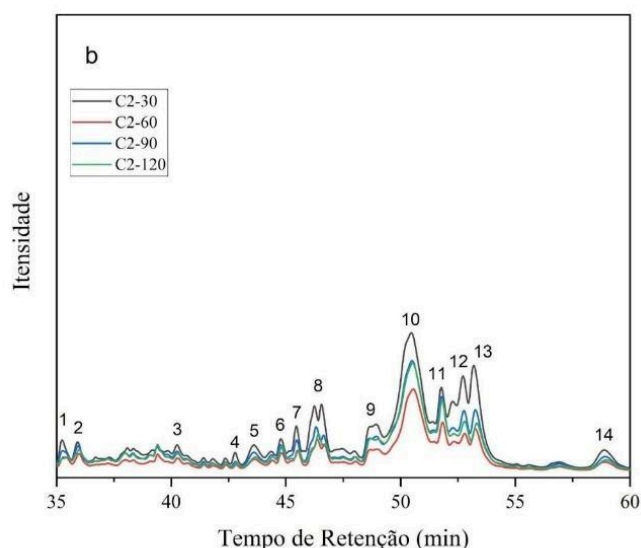
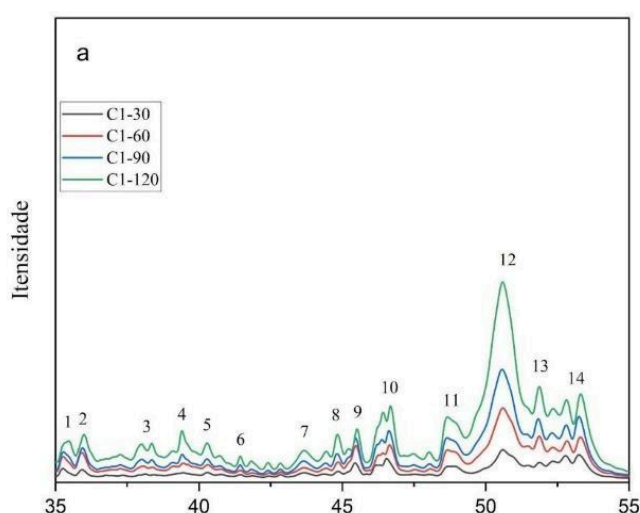
Os resultados de ACP obtidos a partir dos espectros NIR (Figura 2b) apresentaram comportamento semelhante ao observado para os espectros MIR, porém com orientação inversa dos componentes principais. No NIR, os dois primeiros CPs explicaram aproximadamente 99,9% da variância total, indicando forte concentração de informação na CP1. A CP1 demonstrou que as amostras aos 30 dias de maturação se diferenciam das demais. Essas diferenças iniciais podem estar relacionadas à capacidade enzimática dos extratos de cardo, que pode influenciar padrões distintos de hidrólise proteica nos estágios iniciais da maturação (De Jesus *et al.*, 2023; Conceição *et al.*, 2018). Além disso, nos períodos iniciais, as interações entre água, gordura e proteínas tendem a ocorrer de maneira diferenciada, contribuindo para distintas formas de reorganização da matriz do queijo, o que é refletido nos perfis espectrais observados.

3.3 Perfil peptídico

Os cromatogramas de peptídeos solúveis em água (PSA) das amostras analisadas estão apresentados na Figura 3, onde foram identificados 14 picos principais com tempos de retenção semelhantes entre as amostras, mas com variações de intensidade, observadas ao longo do período de maturação. A seleção dos picos foi realizada com base na análise visual dos cromatogramas, priorizando aqueles que apresentaram maior intensidade e melhor definição, especialmente na região de maior tempo de retenção, associada a peptídeos mais hidrofóbicos.

Para o coagulante C1 (Figura 3a) observou-se o aumento da intensidade dos picos localizados na região de maior tempo de retenção, particularmente os picos 12, 13 e 14, entre 50 e 55 minutos, com destaque para as amostras com 120 dias de maturação. O pico 12 apresentou a maior intensidade entre os tempos avaliados, o que pode estar associado ao acúmulo de peptídeos mais hidrofóbicos ao longo da maturação, uma vez que peptídeos com maior hidrofobicidade tendem a eluir em tempos de retenção mais elevados em cromatografia líquida em fase reversa. Comportamento semelhante foi observado por Pinheiro *et al* (2025), que relatou aumento no número e na área dos picos ao longo da maturação, indicando maior liberação de produtos de proteólise, atribuída à ação das proteases responsáveis pela hidrólise das proteínas.

Figura 3. Cromatogramas dos peptídeos solúveis em água (PSA) de do queijo Serpa aos 30, 60, 90 e 120 dias de maturação. a) Extratos de PSA de queijos produzidos com o coagulante C1 ; b) Extratos de PSA de queijos produzidos com o coagulante C2

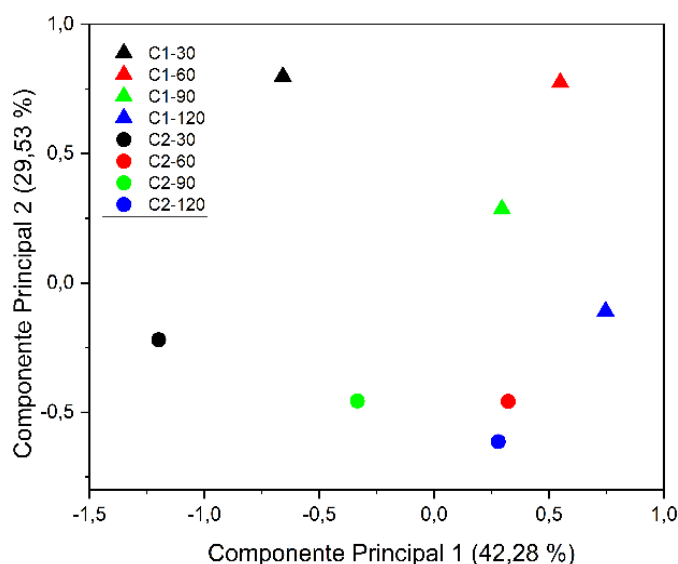


Observou-se maior intensidade dos picos (Figura 3b) quando se utiliza o coagulante C2, especialmente do pico 10, aos 30 dias de maturação, indicando uma liberação mais intensa de peptídeos nos estágios iniciais do processo. Com o avanço da maturação, a intensidade desses picos apresentou redução relativa, sugerindo que os peptídeos formados inicialmente podem sofrer degradação adicional ou transformação ao longo do tempo. Embora os picos 11, 12 e 13 também estejam presentes, suas intensidades foram inferiores às observadas no tratamento C1, refletindo um padrão distinto de proteólise associado ao coagulante C2, visto que esse coagulante possui a presença da cardosina A, ou seja, a quebra das proteínas acontece de forma mais específica (Gomes *et al.*, 2024).

As diferenças observadas nos perfis de peptídeos entre os tratamentos C1 e C2 podem ser atribuídas a variações naturais na composição e na atividade das proteases presentes nos extratos de cardo, mesmo sendo provenientes da mesma espécie vegetal. Essas variações influenciam a especificidade e a intensidade da clivagem das caseínas, determinando quais regiões da proteína são hidrolisadas inicialmente e, conseqüentemente, o tipo de peptídeo liberado (Onelli *et al.*, 2026; Barracosa *et al.*, 2021; Mazorra-Manzano *et al.*, 2018). Assim, o coagulante C1 favoreceu a formação e o acúmulo de peptídeos mais hidrofóbicos ao longo da maturação, enquanto o coagulante C2 promoveu uma liberação mais intensa de peptídeos de caráter intermediário nos estágios iniciais, com posterior transformação desses compostos ao longo do processo de maturação do queijo.

Esse comportamento está relacionado às reações bioquímicas que ocorrem durante a maturação, especialmente à degradação progressiva das caseínas. A cromatografia líquida em fase reversa (RP-HPLC) permite avaliar o perfil de peptídeos de acordo com a hidrofobicidade, uma vez que moléculas de caráter mais apolar tendem a eluir em maiores tempos de retenção na coluna, enquanto peptídeos mais polares eluem mais rapidamente. Dessa forma, os picos iniciais estão associados à presença de peptídeos mais hidrofílicos e de menor tamanho, característicos das etapas iniciais da hidrólise das caseínas, enquanto picos com maiores tempos de retenção indicam peptídeos mais hidrofóbicos, típicos de estágios mais avançados da maturação (Silva *et al.*, 2023).

Figura 4. Dispersão dos Componentes Principais (ACP) obtida a partir do perfil cromatográfico dos peptídeos solúveis em água (PSA) de queijos produzidos com extratos de cardo com perfis enzimáticos distintos e maturados por 30, 60, 90 e 120 dias.



Os componentes principais (CP) explicaram 71,81% da variância total dos dados, sendo 42,28% atribuídos à CP1 e 29,53% à CP2. Observou-se a formação de agrupamentos definidos entre as amostras, com distribuição ao longo do tempo de maturação. As amostras tendem a se posicionar em lados opostos dentro do mesmo quadrante, indicando diferenças no perfil de peptídeos ao longo do tempo.

As amostras de C1 e C2 aos 30 dias de maturação apresentaram correlação negativa com os componentes principais, evidenciando comportamento distinto em relação aos demais tempos. Para o coagulante C2, observou-se o agrupamento das amostras de 60 dias com as de 120 dias de maturação, sugerindo que, a partir desse período, o perfil de peptídeos tende a se estabilizar. Esse comportamento indica que as reações proteolíticas ocorrem de forma mais intensa nas fases iniciais, tornando-se menos variáveis nos estágios intermediários e finais da maturação.

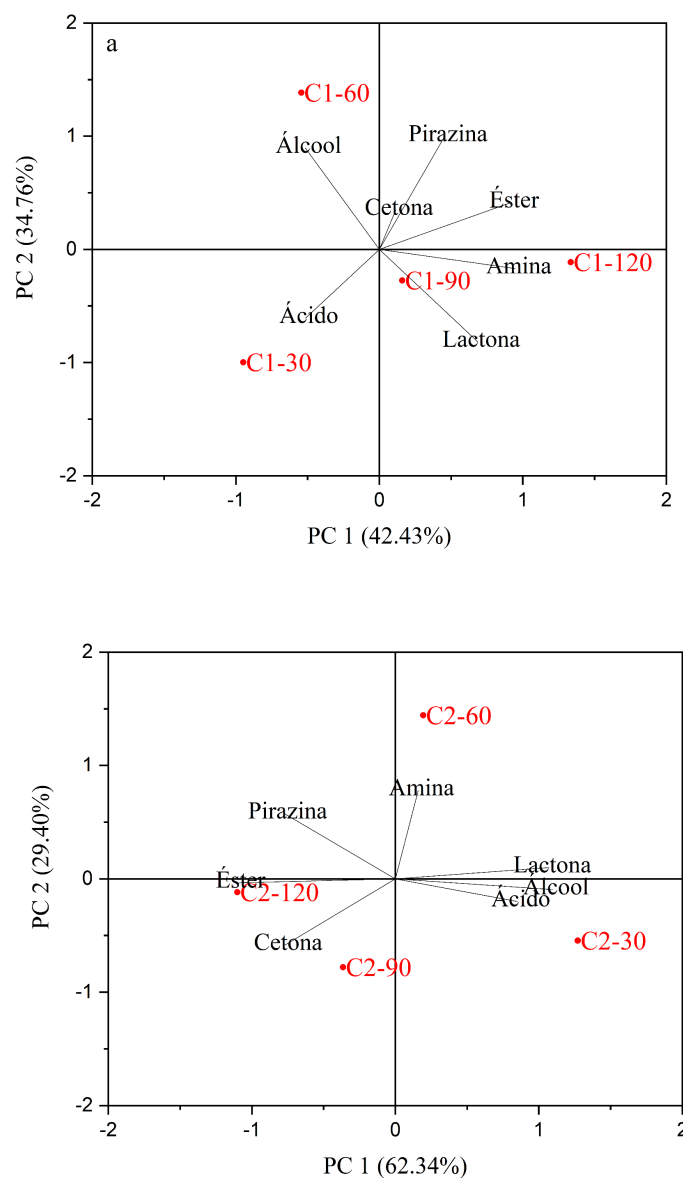
3.4 Perfil de compostos voláteis

A análise dos compostos voláteis permitiu identificar diferentes classes nos queijos Serpa ao longo da maturação, incluindo álcoois, ácidos graxos, ésteres, cetonas, lactonas, pirazinas e compostos nitrogenados. A ACP evidenciou padrões de agrupamento e correlação entre as variáveis, permitindo observar que os coagulantes e o tempo de maturação contribuem de forma distinta. A formação e a variação desses compostos estão associadas às reações que ocorrem naturalmente no queijo durante esse processo, como proteólise, lipólise, degradação da lactose, oxidação de lipídios, além da ação de leveduras e bactérias envolvidas na produção (Saremnezhad *et al.*, 2024).

Na Tabela S1 estão apresentados os compostos voláteis selecionados para a análise de ACP, bem como sua classificação por classe química. A seleção dos compostos foi baseada na maior área relativa, na frequência de ocorrência ao longo da maturação e na literatura, que descreve as classes químicas mais relevantes para a formação do aroma de queijos (Fox *et al.*, 2017; Saremnezhad *et al.*, 2024; Macedo *et al.*, 2025). Dessa forma, a utilização desses compostos na ACP permitiu ver o agrupamento durante a maturação.

A CP (figura 5a) explicaram 77,19% da variância total dos dados, sendo a CP1 responsável por 42,43% e a CP2 por 34,76%. A distribuição das amostras ao longo dos eixos mostra que os queijos se separam de acordo com o tempo de maturação, indicando mudanças no perfil de compostos voláteis ao longo desse processo. Aos 30 dias, as amostras concentraram-se no quadrante inferior esquerdo do gráfico, associadas principalmente aos ácidos graxos, o que é compatível com as etapas iniciais da lipólise. Aos 60 dias, observa-se o deslocamento das amostras para o quadrante superior esquerdo, em associação com os álcoois, classe de compostos comumente relacionada às transformações que ocorrem durante a maturação de queijos (Saremnezhad *et al.*, 2024).

Figura 5 – Dispersão dos Componentes Principais do perfil de compostos voláteis dos queijos produzidos cardos com diferentes perfis enzimáticos ao longo da maturação. C1- Sem cardosina A. C2- Com cardosina A.



A partir de 90 dias de maturação, o perfil volátil do tratamento C1 passa a se associar a outras classes químicas. As amostras se relacionam principalmente com cetonas e lactonas, enquanto aos 120 dias se associam a ésteres, aminas e pirazinas, refletindo alterações progressivas no perfil aromático ao longo da maturação. Esse comportamento está relacionado às transformações bioquímicas típicas do processo de maturação, especialmente à intensificação da lipólise e da proteólise, que favorecem a formação de compostos voláteis de maior complexidade em estágios mais avançados do processo, em torno de 90 a 120 dias. (Cerra *et al.*, 2025).

A análise de componente principal (CP) (Figura 5b) explicaram 91,74% da variação total, sendo 62,34% atribuídos à CP1 e 29,40% à CP2. Aos 30 dias, as amostras do tratamento C2 localizam-se no quadrante direito do gráfico, associadas principalmente a lactonas, ácidos e álcoois que são relacionados a notas lácteas, amanteigadas, intensas e alcoólicas (Fox *et al.*, 2017; Rampanti *et al.*, 2023; Saremnezhad *et al.*, 2024). Aos 60 dias, houve maior presença de amins, o que sugere intensificação da proteólise nessa fase da maturação. Já no final da maturação, o perfil volátil volta a se modificar, com destaque para cetonas, ésteres e pirazinas. Esses compostos são típicos de reações oxidativas e microbianas mais avançadas e ajudam a explicar o aumento da complexidade aromática observada nos períodos finais de maturação (Fox *et al.*, 2017). Diante disso, o tratamento C2 demonstrou ter uma maior intensidade de produção de voláteis nos primeiros dias de maturação, isso pode ser explicado pela presença da cardosina A.

Esse comportamento reforça que a presença ou a ausência das cardosinas podem influenciar de maneira diferente o perfil de voláteis e que juntamente com a maturação influenciam as características físicas, químicas e sensoriais do produto (Alvarenga *et al.*, 2025; Dargère *et al.*, 2023; Barracosa *et al.*, 2021). Nesse contexto, Macedo *et al.* (2025) identificaram diferentes classes de compostos voláteis no queijo Serpa, incluindo álcoois, cetonas, ésteres e compostos nitrogenados, e demonstraram, por análise multivariada, que essas classes apresentaram associações distintas com a qualidade sensorial do produto, evidenciando a relação entre o perfil volátil e as pontuações de sabor e odor atribuídas por painel sensorial treinado. Esses estudos reforçam que os compostos voláteis são influenciados por diferentes condições de produção e que a variabilidade enzimática também pode contribuir para essas variações.

4 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que os extratos enzimáticos C1 e C2 influenciaram de maneira distinta o desenvolvimento do queijo Serpa ao longo da maturação, afetando principalmente as reações bioquímicas de proteólise e a formação de compostos voláteis. A ausência da cardosina A no tratamento C1 resultou em diferenças no perfil proteolítico e espectroscópico, evidenciando o papel dessa enzima nas transformações ao longo da maturação.

Considerando que o queijo Serpa apresenta características amanteigadas e é tradicionalmente consumido em estágios iniciais de maturação, em torno de 30 dias, o tratamento C2 demonstrou melhor desempenho nos parâmetros avaliados, destacando-se pela maior intensidade da lipólise, perfil de peptídeos mais expressivo e desenvolvimento mais pronunciado de compostos voláteis.

Dessa forma, os resultados indicam que o perfil enzimático do coagulante exerce influência direta na definição das características finais do queijo, podendo ser utilizado como uma ferramenta tecnológica para direcionar a qualidade e o perfil sensorial do produto.

5 REFERÊNCIAS

- 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.2024.10615>
- Barracosa, P., Simões, I., Martins, A. P., Barros, M., & Pires, E. (2021). **Biochemical diversity of cardoon flowers (*Cynara cardunculus* L.): Predicting PDO Mediterranean cheese textures.** *Food Bioscience*, **39**, 100805. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100805>
- 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>
- Freitas, S., Belo, A., Brás, T., Paulino, A., & Duarte, M. F. (2018). ***Cynara cardunculus*: Use in cheesemaking and pharmaceutical applications.** In N. Koca (Ed.), *Technological approaches for novel applications in dairy processing*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76530>
- Atasever, M., & Mazlum, H. (2024). **Biochemical processes during cheese ripening.** *Veterinary Science and Practice*, **19**(3), 174–182. <https://doi.org/10.17094/vetsci.1609184>
- Macedo, A., Carvalho, M. J., Mecha, E., Costa, L., Ferreira, A., Inácio, R. S., & Bronze, M. R. (2025). **Matching the sensory analysis of Serpa PDO cheese with the volatile profiles: A preliminary study.** *Foods*, **14**, 1509. <https://doi.org/10.3390/foods14091509>
- Saremnezhad, S., Soltani, M., Tekin, A., Kanmaz, H., Sahingil, D., Kaya, B., Gökçe, Y., & Hayaloglu, A.A. (2024). **Influence of the blends of sheep's and goat's milk on the functional properties and volatile compounds of Lighvan cheese during ripening: A comparative study.** *Food Science & Nutrition*, **12**, e4543. <https://doi.org/10.1002/fsn3.4543>
- Silva, L. K. R., De Jesus, J. C., Onelli, R. R. V., Conceição, D. G., Santos, L. S., & Ferrão, S. P. B. (2023). **Spectroscopy (MIR), chromatography (RP-HPLC) and chemometrics applied to soluble peptides to discriminate the geographic origin of coalho cheese.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **50**, Article 102678. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102678>
- Cardoso, K. L. R., de Jesus, J. C., Dargère, A. F., Capela, A. P. da, Oliveira, T. de 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**, Article 144466. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144466>
- Conceição, C., Martins, P., Alvarenga, N., Dias, J., Lamy, E., Garrido, L., Gomes, S., Freitas, S., Belo, A., Brás, T., Paulino, A., & Duarte, M. F. (2018). ***Cynara cardunculus*: Use in cheesemaking and pharmaceutical applications.** In N. Koca (Ed.), *Technological approaches for novel applications in dairy processing*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76530>
- 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>
- Inácio, R. S., Monteiro, M. J. P., Lopes-da-Silva, J. A., Saraiva, J. A., & Gomes, A. M. P. (2025). **Effect of high-pressure processing on proteolysis, texture and sensorial attributes**

of raw ewe's cheeses throughout storage. Applied Sciences, 15(12), 6562. <https://doi.org/10.3390/app15126562>

De Jesus, J. C. de, Onelli, R. R. V., Faria, P. B., Melli, A. B., Souza, M. F. R., Lage, A. P., Dorneles, E. M. S., & Ferrão, S. P. B. (2026). ***Chemometric screening models to verify the geographical origin of traditional Brazilian cheese***. International Dairy Journal, 174, 106518. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2025.106518>

Della Cerra, F., Garro, G., Cozzolino, R., De Pascale, S., Esposito, M., Picariello, G., Caira, S., Scaloni, A., Marino, F., & Addeo, F. (2025). ***Proteolysis and volatile compounds in Mediterranean buffalo milk blue cheese: Quality determinants and functional peptides***. Journal of Agriculture and Food Research, 21, 101923. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2025.101923>

Cai, H., Bijl, E., Scholten, E., & Sala, G. (2023). ***Effect of plasmin on casein hydrolysis and textural properties of rennet-induced model cheeses***. Food Research International, 165, 112421. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112421>

Mazorra-Manzano, M. A., Moreno-Hernández, J. M., & Ramírez-Suarez, J. C. (2018). ***Milk-clotting plant proteases for cheesemaking***. In M. G. Guevara & G. R. Dale (Eds.), *Biotechnological applications of plant proteolytic enzymes* (pp. 21–41). Springer

Mohsin, A. Z., Norsah, E., Marzlan, A. A., Abd Rahim, M. H., & Meor Hussin, A. S. (2024). ***Exploring the applications of plant-based coagulants in cheese production: A review***. International Dairy Journal, 148, 105792. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105792>

PORTUGAL. Decreto Regulamentar n.º 39/87, de 29 de junho. Cria a região demarcada do Queijo Serpa. Diário da República, n.º 146/1987, Série I, 29 jun. 1987. Disponível em: <https://dre.pt>

Tolentino, I. C. de S. A., de Jesus, J. C., Conceição, D. G., Onelli, R. R. V., Reis, L. C. C., Santos, L. S., & Ferrão, S. P. B. (2023). ***Use of MIR spectroscopy associated with chemometric techniques to verify the authenticity of prato cheese***. International Dairy Journal, 142, 105643. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105643>

TABELA 2- Valores de área relativa (% área) dos principais compostos voláteis identificados por cromatografia gasosa (CG) nos queijos Serpa. C1 e C2 referem-se aos diferentes extratos de *Cynara cardunculus*, e os números (30, 60, 90 e 120) indicam o tempo de maturação (dias).

Composto		Área							
		C1-3 0	C1-6 0	C1-9 0	C1-12 0	C2-3 0	C2-6 0	C2-9 0	C2-12 0
PYRAZINE, TRIMETHYL-	Pirazi na	0	1,15	0,47	0,43	0,06	0,04	0,02	0,02
PYRAZINE, TETRAMETHYL-	Pirazi na	0	0,97	0,34	0	0	0	0,37	0
2-ETHYL-3,5,6-TRIMETHYLPYRA ZINE #	Pirazi na	0	0,09	0	1,4	0,22	0,	0	0
2,3-BUTANEDIOL	Álcoo l	18,07	21,24	12,11	9,38	4,1	0	0	70,9
Phenethyl alcohol	Álcoo l	0,49	3,12	3,02	2,01	1,79	1,57	1,65	1,7
1-BUTANOL, 3-METHYL-	Álcoo l	0	4,38	6,45	2,1	3,5	4,34	4,99	0,13
2,7-DIMETHYL-4,5-OCTANEDIOL	Álcoo l	0	2,06	1,71	1,59	0,1	8,96	1,01	2,17
NONANOIC ACID, 5-HYDROXY-,. DELTA. -LACTONE	cetona	0,03	0	0,04	0,05	3,04	3,63	2,88	7,73
Heptyl methyl ketone	cetona	0	0,99	0,71	0	3,11	2,7	2,14	5,86
2-BUTANONE, 3-HYDROXY-	cetona	0	0	1,26	0,39	0	0	0	10,75
Butyrate <ethyl->	Éster	2,88	2,49	5,54	0	1,5	0,46	1,07	0,88
1-BUTANOL, 3-METHYL-, ACETATE	Éster	1,6	1,86	2,02	1,81	0	1,43	0	2,45
HEXANOIC ACID, ETHYL ESTER	Éster	2	0	5,05	0,17	7,41	10,59	1	0,32
PROPANOIC ACID, 2-METHYL-, ETHYL ESTER	Éster	0,31	1,03	0,84	2,14	0,84	0,52	0	0,46

Octanoate <ethyl->	Éster	2,51	0	3,91	6,19	1,76	0	18,49	3,58
Decanoate <ethyl->	Éster	3,55	2	3	7,16	3,55	2	3	7,16
Capronate <ethyl->	Éster	0	5,64	0	10,75	0	0,52	0,46	6,52
OCTANOIC ACID, ETHYL ESTER	Éster	0	5,87	0	0	0	5,87	0	0
BUTANOIC ACID, 3-METHYL-	Ácido graxo	1,26	0,17	1,09	0,98	1,26	0,17	1,09	0,98
HEXANOIC ACID	Ácido graxo	0,54	0,81	0	1,18	0,54	0,81	0	1,18
Capric acid	Ácido graxo	7,41	10,59	1	0,32	1,76	4,4	18,49	3,58
DODECANOIC ACID	Ácido graxo	0,86	0	0,62	0	0	0	0,42	0
Butyric acid	Ácido graxo	1,76	0	5,44	3,58	0	0	5,44	0,22

