



# MANUAL DE BOAS PRÁTICAS

NOVEMBRO 2022





PARCEIROS:



UNIVERSIDADE  
CATOLICA  
PORTUGUESA



Politécnico  
de Viseu



UNIVERSIDADE DE ÉVORA



INSTITUTO  
POLITÉCNICO  
DE BEJA  
Agrária



Instituto Politécnico  
de Castelo Branco



iniav



cebal  
Centro de Biotecnologia Agrícola  
e Agro-Alimentar do Alentejo



CATAA  
CENTRO DE APOIO  
TECNOLÓGICO AGRO ALIMENTAR



SABORES & AMBIENTE  
Serra da Estrela  
saboreseambientes@gmail.com



ANCOSE  
Associação Nacional de Criadores  
de Ovinos Serra da Estrela

APOIOS:



PROGRAMA DE  
DESENVOLVIMENTO  
RURAL 2014-2020



PORTUGAL  
2020



UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Europeu Agrícola  
de Desenvolvimento Rural  
A Europa investe nas Zonas Rurais

## DA FLOR AO QUEIJO

Apresentamos algumas boas práticas que devem ser desenvolvidas desde o cultivo de cardo até à produção de queijo, o exemplo mais clássico e privilegiado de utilização de uma das formas de biomassa para a produção de um ícone que é a verdadeira força motora do interesse desta região nesta planta. A produção de biomassa tem que responder a um conjunto de pressupostos para se tornar uma cultura rentável permitindo a obtenção de outros tipos de biomassa para além da flor. O maior benefício do cultivo tradicional é o baixo custo de produção aliado às questões de rentabilização em zonas mais desfavorecidas e com benefício para a preservação dos solos e sustentabilidade ambiental.

***A qualidade das proteases é dependente do genótipo das plantas, das condições ambientais, fertilização, e práticas culturais. As proteases nas flores apresentam uma elevada concentração, grande estabilidade e uma extração facilitada. Mas para isso a forma de corte, colheita e secagem das flores é de crucial importância para as fases subsequentes de obtenção de extrato e queijos de grande qualidade.***

Neste sentido, dedicamos um ponto específico para a colheita da flor mencionando algumas práticas que devemos ter em atenção. A preparação dos extratos é uma das áreas onde há ainda espaço para melhorar não apenas as atividades como a longevidade dos extratos com o objetivo de se poder facilitar a tarefa dos queijeiros que preparam, diariamente, os seus extratos, muitos deles com vários extratos por dia. No último ponto descrevemos alguns dos processos que são típicos e cruciais para a produção de queijos DOP de excelência. A estratégia de adoção de práticas da agricultura biológica, assente em princípios de equilíbrio e sustentabilidade, do solo, das culturas, adequadas às épocas do ano e tendo por base uma comercialização, justa e em proximidade, com redução da pegada de carbono, parece ser o melhor caminho para guindar esta cultura ao sucesso. As práticas agrícolas, são uma das áreas onde mais se tem de apostar, aliando o conhecimento empírico, no combate às pragas e doenças, às estratégias mais inovadoras creditadas cientificamente. O uso de fungicidas e bactericidas, de base natural, para a utilização em culturas agrícolas deve assumir-se como uma das grandes mais-valias de futuro.



# A Cultura do Cardo

## Origem e Domesticação



A origem e os processos de domesticação do género *Cynara* não estão ainda cabalmente esclarecidos, sendo um assunto relevante para a compreensão da sua evolução. O ancestral comum do género *Cynara* com origem, provável, no norte de África, terá sofrido a partir desta geografia um processo de especiação. Durante o Holoceno, um período quente no intervalo compreendido entre os 9000 a 5000 anos o género distribuiu-se por várias vias para uma área mais vasta de forma consistente e diversa. As espécies *C. cornigera* e *C. humilis*, terão sido originadas há cerca de 20 mil anos, enquanto o grupo formado pelas espécies *C. cardunculus*, *C. baetica* e *C. syriaca* um pouco mais recentemente (16 mil anos).

As domesticações da alcachofra e do cardo ocorreram de formas distintas, separadas no tempo e no espaço, levando as duas culturas a divergirem, no modo de propagação, nas características morfológicas e uso final. A alcachofra é propagada sobretudo vegetativamente privilegiando a obtenção de capítulos grandes, não espinhosos, para consumo em fresco enquanto o cardo é propagado por aquénios para produção de folhas e pecíolos de grandes dimensões igualmente para uso alimentar. Atualmente estamos a desenvolver uma terceira via de domesticação que privilegie a produção de flor de cardo para uso como agente coagulante de queijos e que possamos valorizar as restantes formas de biomassa em aplicações valorizadas.



1. Aquénios

## Morfologia



2. Folhas Basais

Com base nos dados morfológicos e moleculares e na extensa biodiversidade existente, o centro de origem da alcachofra terá sido, provavelmente, o sul de Itália e o processo de domesticação terá decorrido na Sicília no início do primeiro milénio enquanto o cardo foi na primeira metade do segundo milénio. Existe um elevado nível de diferenciação no pool genético do cardo selvagem proveniente das regiões oeste e este do Mediterrâneo. As amostras provenientes do Mediterrâneo ocidental revelam-se próximas do cardo cultivado suportando a tese de que o cardo cultivado terá sido domesticado na região oeste do Mediterrâneo.

Em termos de descrição morfológica a espécie *Cynara cardunculus* é uma planta perene com uma raiz apumada grossa, vivaz (rizoma) e normalmente de porte elevado, com um ou vários caules, que podem atingir os 3 m de altura um diâmetro de 26-50 mm na base, 21-30 mm na zona média e 10-20 mm no topo, e um número muito variável de ramificações primárias, secundárias e consequentemente de capítulos.

As folhas basais, dispostas em roseta, são grandes (60-120 x 25-54 cm), penínérveas, lanceoladas penatipartidas, com recortes profundos, que se voltam a dividir, a ultrapassarem metade da distância entre a margem e a nervura central, terminando em espinhos mais ou menos rígidos de cor castanha-clara, cuja dimensão e abundância pode variar. O segmento terminal é maior que os laterais e todos penatifendidos, tendo as faces adaxial e abaxial cobertas por tomentos. As folhas dispõem-se com uma densidade variável ao longo do caule, inseridas na base das ramificações.

O número de inflorescências (capítulos) é muito variável por caule e por planta, podendo atingir 50-60 no cardo cultivado, dependendo da arquitetura da planta e do número de caules.





3. Inflorescências

Cada planta produz inflorescências grandes, médias e pequenas, sendo as maiores aquelas que são formadas nos ápices da ramificação principal, seguidas das primárias e secundárias. As inflorescências (capítulos) são polimórficas em relação à dimensão e forma e algumas desenvolvem brácteas externas espinhosas com várias tonalidades de verde que, durante o desenvolvimento, podem adquirir um tom purpúreo. As inflorescências são do tipo corimboso, volumosas globosas ou ovóides (33-75 mm x 32-95 mm), de brácteas ovadas a elíticas (65-110mm), arranjadas em séries de 5-8, com as externas e médias, gradualmente, atenuadas numa ponta espinhosa.

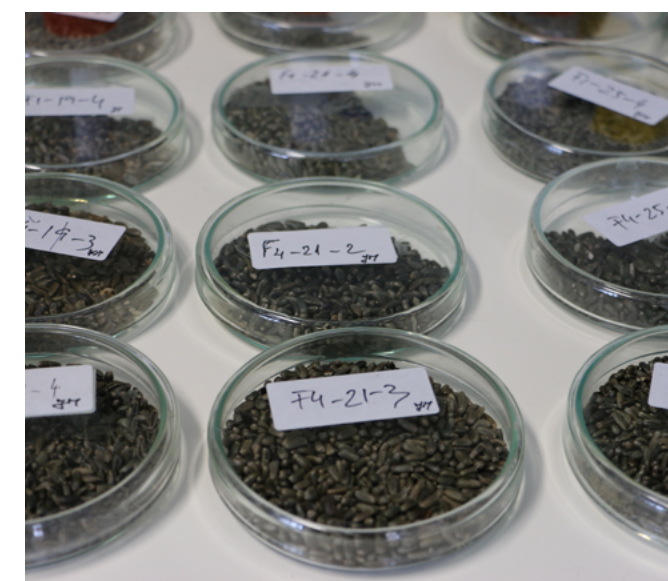
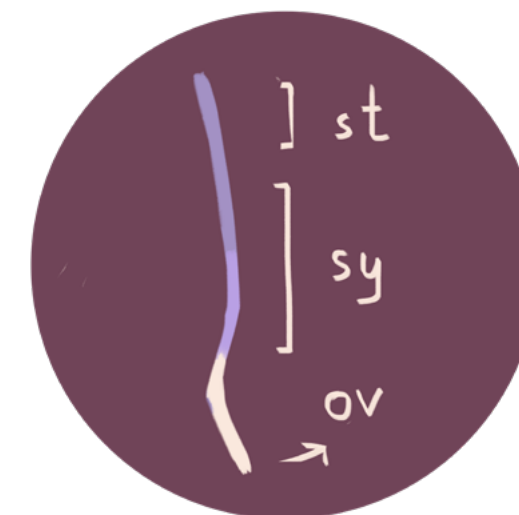
As inflorescências são compostas por centenas de flores individuais hermafroditas [80-240- (800)] que vão nascendo em grupos, ao longo de vários dias, em cada inflorescência, com uma dimensão de [40 (60) mm x 0,1-0,2 mm)], coloração lilás pálido a escuro ou branca com corola do tipo gamopétalo com cinco lobos iguais (32-53,4 mm x 1,6-2,3 mm), fundidas nas extremidades (simpétala). O cálice é constituído por sépalas modificadas com aspeto piloso. O androceu caracteriza-se por apresentar cinco estames, com filetes livres e anteras soldadas que envolvem o estilete. As flores libertam uma fragrância intensa e néctar abundante. De uma única inflorescência é possível obter até 400 mg de pólen branco-marfim do tipo tricolpado. A superfície

estigmática está recetiva ao pólen até 2 a 3 dias após a sua libertação e, deste modo, a fertilização das flores periféricas pode ser efetuada pelo pólen das mais interiores, uma vez que o processo de floração na inflorescência progride da periferia para o centro. A polinização é entomófila e a reprodução é principalmente por fecundação cruzada. Os estiletes das flores de *C. cardunculus* são do tipo sólido, tratando-se de uma estrutura cilíndrica fundida, sem ranhuras. O estilete está formado por uma única capa de epiderme com uma cutícula espessa, rica em lípidos e açúcares, rodeando várias camadas de células do parênquima cortical. O centro desta estrutura está ocupado por feixes vasculares e tecido de transmissão.

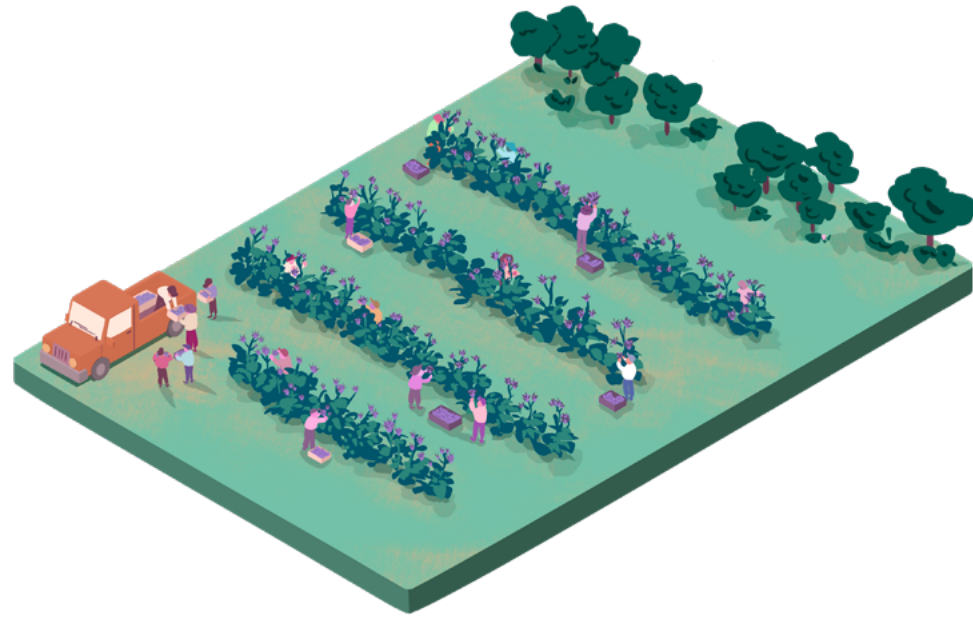
O fruto do cardo é um aquénio (cipsela) que deriva de um ovário inferior. Os aquénios apresentam uma superfície lisa e glabra com uma coloração castanho-acinzentada a preto brilhante, usualmente com pontos castanhos-escuros e linhas longitudinais curtas. Os aquénios são comprimidos lateralmente, mais ou menos obovados, apicalmente convexos, com uma dimensão variável [3,7-7 x 2,2-3,2 mm (*var. sylvestris*); 6,5 – 8,1 x 2,8-3,5 mm (*var. altilis*)], um peso individual de 20 a 60 mg e apresentam um papilho com numerosos pelos com 16-41 mm. Embora existam dois carpelos fundidos na flor, há apenas um lóculo e apenas uma semente por aquénio. Quando os aquénios atingem a maturação começam a ser disseminados pelo vento (anemocoria), o anel (decíduo) de tecido pericárpico, onde as longas cerdas plumosas se encontram unidas é destacado como uma unidade. O amadurecimento dos aquénios dura 50 a 60 dias.

4. Pistilo (cima)

5. Aquénios (baixo)







6. Campo de cultivo

## Ciclo Cultural

O ciclo cultural do cardo adequa-se a uma diversidade de climas e solos com as chuvas outonais a serem determinantes na rebentação da cultura e uma precipitação regular ao longo do inverno e primavera a propiciar valores elevados de biomassa.

O nosso objetivo para a cultura centra-se na produção de flor que é um dos ingredientes obrigatórios na identidade e exclusividade de queijos DOP como o Serra da Estrela. Contudo, as enormes capacidades de produção de diversas formas de biomassa podem complementar de forma sinérgica a valorização desta cultura. Este modelo de produção pode ser aplicado, com as devidas adaptações, a todas as regiões que utilizem ou pretendam vir a utilizar flores cardo na produção de queijo, não apenas para preservar e melhorar a qualidade do queijo, mas

também as paisagens, os ecossistemas e a economia desses territórios. Na região Centro temos um mosaico agrícola e um ecossistema industrial que permite ser uma referência no Mundo no âmbito da valorização multifuncional e pluridisciplinar do cardo.

O cardo apresenta um ciclo anual de crescimento no Outono-Verão e apesar do ciclo reprodutivo terminar no Verão preserva um sistema radicular que permite o armazenamento de hidratos de carbono para o novo ciclo de crescimento. O sistema radicular, pelas suas características, é capaz de extrair água e nutrientes de zonas profundas do solo, revelando uma boa adaptação a ambientes caracterizados por elevados stresses abióticos, com um potencial de cultivo em locais com condições climáticas e edáficas

normalmente pouco favoráveis, comuns em muitas áreas da bacia mediterrânea. No início do outono as gemas da parte basal ou dos próprios rizomas da planta brotam dando início a um novo ciclo. As folhas desenvolvem-se e podem ser colhidas até ao início do lançamento do caule que ocorre em abril e que cresce rapidamente podendo atingir 2-3 m de altura. Se a planta for obtida por via seminal num primeiro ano apenas se desenvolve um caule. Nos anos subsequentes o número de caules pode ser muito variável dependendo da genética que determina a arquitetura e da estratégia de adaptação da planta face às condições edafoclimáticas. Nos caules desenvolvem-se ramificações primárias, secundárias e terciárias que terminam em capítulos e cujo número total pode ser muito variável por caule e por planta podendo atingir os 20 capítulos num caule e 60 capítulos numa planta. Os capítulos irão florir com a colheita das flores a ocorrer em junho-julho. Durante a floração os processos de polinização e fecundação dão origem aos aquénios que podem ser colhidos no início de setembro, antes de ocorrer a disseminação.

No segundo ano e subsequentes, o desenvolvimento vegetativo é maior e mais rápido, superando a competição com espécies infestantes pelo grande vigor da planta e dimensão das suas folhas. Esta sucessão de ciclos anuais de crescimento pode, em muitos casos, durar mais de 15 anos. Na prática, o primeiro ciclo de crescimento é para o estabelecimento da planta e os seguintes são ciclos produtivos que, em condições normais, atingem a maturidade plena ao fim de 3-4 anos.

Em condições favoráveis podemos obter já produção de flor no ano de instalação, sendo que no primeiro ano a produção é

muito limitada por se desenvolver apenas um caule.

No início de setembro, após a colheita de toda a biomassa aérea remanescente de caules, capítulos e folhas secas com baixos teores de humidade, a cultura está pronta para a renovação do ciclo cultural devido à elevada acumulação de nutrientes nas raízes, potenciada pelas primeiras chuvas de setembro características na região. As práticas agrícolas e culturais mais recomendadas para a cultura do cardo, as formas de fertilização, mais tradicionais ou inovadoras, os níveis de emissão de gases com efeito de estufa associados com as diversas formas de fertilização, bem como a fixação de carbono são fatores importantes para avaliarmos os impactos positivos desta cultura. Apesar de ainda serem necessários mais estudos, a aplicação de biochar pode ser recomendada como um procedimento de mitigação para fins agroambientais, por reduzir o potencial de aquecimento global e aumentar significativamente a produção de biomassa das plantas. A irrigação mostrou, igualmente, ser uma prática que aumenta de forma significativa as produções de biomassa do cardo.



7. Apanha do cardo

Contudo, podemos ter em consideração outras formas de cultivo que privilegiem o uso de práticas mais sustentáveis e que requeiram menos recursos. O cardo é uma cultura que, para além do potencial produtivo, pode desempenhar um papel de sustentabilidade ambiental pela eficácia na utilização dos recursos, na prevenção da erosão dos solos a par de questões relacionadas com a fitorremediação e o sequestro de carbono. Produzir com uma qualidade diferenciada de forma eficiente e sustentável perspetivando as alterações climáticas são requisitos obrigatórios para o sucesso na agricultura de futuro.

## Plantação

O modo de preparação do terreno e plantação requerem os cuidados e práticas de uma cultura agrícola. A definição do compasso e a densidade de plantas por hectare são de crucial importância para definir os níveis de produtividade de biomassa e de flor e a facilidade de colheita. Para essa otimização é determinante um alinhamento rigoroso das plantas.

A densidade e os propósitos da cultura irão determinar quais as cultivares ou genótipos que pretendemos instalar.

A preparação do solo para a instalação do cardo consiste em efetuar uma ripagem em solos seguida de uma gradagem cruzada (1ª passagem ao longo da ripagem, 2ª passagem na perpendicular).

A sementeira é efetuada com um semeador de precisão. É aconselhável a aplicação de um herbicida de pré-emergência. Após a emergência (4 meses depois) para o controlo das infestantes poderá ser necessário o tratamento com herbicida ou passagem de um corta-matos ou gadanheira.



8. Textura do solo



A instalação do sistema de rega gota-a-gota, sendo opcional, em função das condições onde se prevê instalar o campo, pode igualmente determinar o compasso e a densidade das plantas a instalar. Cada conduta de rega poderá regar simultaneamente duas linhas de plantas colocadas paralelamente de forma alternada, embora o ideal seja sempre uma conduta por cada linha de plantas.

A abertura das covas pode ser realizada manual ou mecanicamente com uma profundidade adequada em função da dimensão da raiz da planta de modo a que se possa colocar algum volume de terra vegetal, turfa e uma adubação adequada para promover o enraizamento. As plantas devem ser retiradas com cuidado das placas de alvéolos para que não se destrua o torrão em redor da raiz. Um dos fatores mais importantes na plantação é a origem e seleção das plantas a instalar ou das sementes no caso de ser sementeira direta. No caso de serem plantas verificar a estrutura e o estado fitossanitário da planta e da raiz em particular. No caso de ser efetuada uma sementeira, esta deverá ser realizada no outono quando se preveja o início da ocorrência de um período de chuvas regular ou na altura da primavera e as sementes devem ser escolhidas e podem ser embebidas em água durante 3 dias para facilitar a germinação. Uma forma alternativa de plantação poderá ser por propagação vegetativa através de brotos obtidos de outras plantas. Esses propágulos podem ser estabelecidos diretamente na plantação, dependendo da estrutura radicular que possam ter ou prepará-los primeiro em viveiro para depois serem plantados no momento mais oportuno quer em termos de porte



9. Abertura de covas (cima)

10. Propagação do cardo (baixo)

quer em termos de época de plantação. Dependendo dos genótipos e dos locais os brotos começam a surgir logo no final do verão o que poderá não ser a altura mais oportuna para plantá-los diretamente no terreno se não tiver uma rega de apoio.

No outono, sendo a época mais indicada os brotos poderão ter uma dimensão vegetativa exagerada pelo que será necessário fazer um corte nas folhas para evitar uma acentuada transpiração. Não sendo particularmente exigente, pelas características profundantes da raiz aconselho que a cultura seja instalada em solos bem drenados, podendo ser estabelecida em camalhões não pronunciados.

Temos como objetivo o uso de genótipos com arquiteturas que proporcionem uma maior de produção em capítulos, flores e biomassa através de uma colheita mais facilitada, comparativamente com o cardo silvestre usado tradicionalmente para recolha de flores, desde que não comprometamos a qualidade bioquímica da flor.

A adubação depende das características do solo e deve ser avaliada em função da quantidade de biomassa produzida ou esperada. Antes de efetuar a sementeira, é recomendável proceder a uma adubação de base, dependendo da fertilidade dos solos. Nos anos subsequentes, uma adubação de restituição é aconselhável para repor os nutrientes que são retirados pelas plantas.

Como esta cultura é grande produtora de biomassa, o cardo consome quantidades significativas de nutrientes. Estima-se que uma colheita das partes aéreas na ordem de 20 t/ha extrairá aproximadamente 277 kg/ha de N, 56 kg/ha de P e 352 kg/ha de K do solo. Estas quantidades de nutrientes e a fertilidade do solo permitem calcular as necessidades de adubação.

11. Plântulas de cardo em estufa







12. Plantas de cardo para plantação

Os primeiros três meses são um período crítico por forma a garantir um crescimento vegetativo da raiz e folhas que permitam à planta ganhar alguma resistência aos frios de inverno. No período de arranque de crescimento na primavera a planta já deve ter uma estrutura com um sistema radicular profundante que permita alguma resistência à secura. Contudo, nesta fase poderá ser necessária alguma suplementação hídrica com alguma adubação para alavancar o crescimento da planta.

A densidade da plantação pode variar, contudo cada planta deverá de dispor de 1 m<sup>2</sup> para um desenvolvimento normal numa fase completamente estabelecida. Na linha as plantas não deverão ser instaladas a menos de 0,75 m e o espaço na entrelinha

não deverá exceder os 1,5m, ariando em função das alfaías agrícolas que possam existir na exploração para a limpeza das entrelinhas em determinados momentos. No caso de se optar por uma maior largura da entrelinha poderão ser colocadas duas linhas em espinha separadas por 0,5 m para se compensar a densidade das plantas.

O terreno deve ser mobilizado em especial na zona da linha até alguma profundidade para permitir que as plantas possam ter um crescimento radicular facilitado. Nesta fase devem ser proporcionadas condições de conforto às plantas para que tenham um bom desenvolvimento e caso haja necessidade deve-se incorporar matéria orgânica que possa conferir uma melhor estrutura do solo.



13. Esquema de instalação das plantas (cima)

14. Plantação (baixo)

No caso de se optar pela sementeira, as sementes podem ser previamente colocadas em água durante 2-3 dias mudada, diariamente, para uma germinação mais facilitada. No solo devem ser colocadas a uma profundidade não superior a 10 cm. São necessários 3 a 4 kg de sementes para um hectare (peso médio de 100 sementes = 3,4g).

No caso de serem plântulas pode ser usado um plantador manual no caso do solo permitir uma fácil penetração para colocar a planta na profundidade aconselhada ou usar um hidrojato para criar um buraco que permita uma boa plantação com uma rega abundante simultânea.

Na prevenção da erosão do solo e na desertificação do solo, o cardo inicia um forte crescimento após as primeiras chuvas de Outono e o crescimento da roseta protege o solo da erosão que constitui um dos maiores perigos ambientais nas áreas da zona semi-árida Mediterrânica.

Promove a melhoria das condições das características do solo, pois após o estabelecimento da cultura do cardo, o único trabalho de campo a realizar é a colheita. Deste modo, o campo de cultivo do cardo não sofre compactação do solo.

As primeiras folhas que formam a roseta acabam por cair enriquecendo de húmus a superfície do solo com melhoria das características físicas do solo (estrutura do solo, permeabilidade e capacidade de infiltração, aumento na capacidade de retenção da água, etc.) e características químicas (aumento do conteúdo de matéria orgânica, capacidade de troca catiónica, disponibilidade de azoto, fósforo, etc.). A salinidade é um dos tipos de stresses que mais limitam o crescimento e produtividade de plantas cultivadas. Mais de 20% da área mundial total cultivada é considerada salinizada. A identificação e seleção de génotipos capazes de germinar em condições de stresse salino é necessário para o sucesso de cultivo em áreas marginais da bacia mediterrânica.

Apesar das diferentes condições de potencial hídrico a *C. cardunculus* var. *altilis* revelou sempre uma percentagem de germinação superior a 75%, comparado com as sementes de *Cynara cardunculus* var. *sylvestris* que revelaram um severo decréscimo na percentagem de germinação com o aumento da condutividade.



## Produção de flor

A produção de flor de cardo por planta depende do número total de inflorescências, das dimensões das inflorescências, do peso individual da flor que são variáveis em função do genótipo, ecótipo, cultivar, da idade da planta e das condições edafoclimáticas que condicionam a arquitetura da planta através do número de caules e número de ramificações e inflorescências de cada caule. São igualmente importantes o procedimento de corte, colheita e secagem. Uma planta produz, em média 2,5 a 5 g de flores por inflorescência, com maiores produções nas principais, seguidas das primárias e secundárias. Uma planta num primeiro ano pode produzir, em média, 36,6 g de flores frescas, dependendo da cultivar, condições ambientais, práticas de cultivo e técnica de corte. Esse valor aumenta no segundo ano para 54,7 g, atingindo, normalmente, uma produção média no terceiro ano de 100 g. A colheita das flores prolonga-se geralmente durante um mês, em função de existirem inflorescências principais, primárias e secundárias que vão entrando, sequencialmente, em floração e de cada capítulo poder dar vários cortes.

As flores de *C. cardunculus* possuem estigmas papilados muito largos do tipo seco. Nas flores completas distinguem-se dois elementos estruturais principais, o conjunto formado pela corola, cálice e estames de tonalidade acastanhada e o



15. Colheita de flores

estigma arroxeadado. Por sua vez, o estigma divide-se na epiderme púrpura papilosa e no tecido fibroso interno. Analisando as flores de cardo usadas por produtores de queijo o estigma representa 44,6 % do peso total da flor e os restantes componentes da flor 55,4 %. Contudo, estes valores podem variar em função da qualidade e proveniência da flor. No estigma, a epiderme púrpura papilosa e o tecido fibroso interno representaram 95 e 5% do peso total do estigma, respetivamente. O processo de corte é realizado, normalmente, de forma manual com recurso a tesoura na zona do estilete abaixo das estruturas florais do cálice permitindo a colheita do máximo peso possível de elementos florais. São raros os produtores que preferem cortar apenas a porção violeta do estigma sem

os restantes componentes das peças florais. A mecanização da colheita das flores é um procedimento que estamos a implementar para facilitar e rentabilizar o processo. É necessário usar ferramentas inovadoras para superar algumas condicionantes sem limitar a qualidade final da flor com o objetivo de se obter um produto padronizado. Existe, normalmente, uma relação direta entre o peso total de flores e o peso total de aquênios. No entanto, a produção de flores pode afetar o rendimento dos aquênios, porque a colheita precoce das flores pode evitar que o tubo de pólen atinja o óvulo para fertilizar e produzir uma semente viável que, normalmente, após a polinização leva dois dias para atingir o óvulo. Neste sentido, poderá ser preferível cortar as flores três a cinco dias após a floração para garantir um maior sucesso na produção dos aquênios sem por em causa a qualidade da flor.



16. Estrutura da flor de cardo (cima)



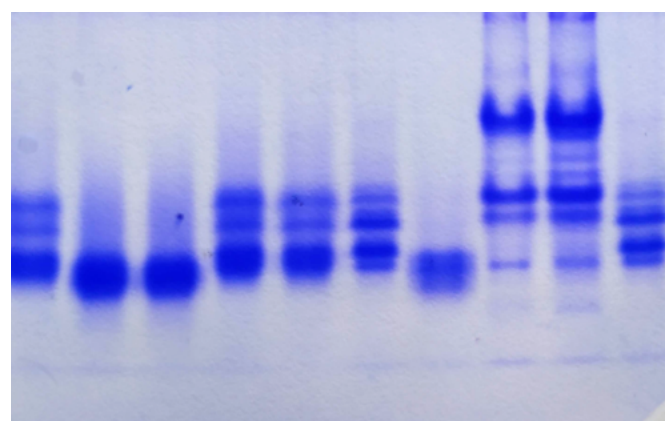
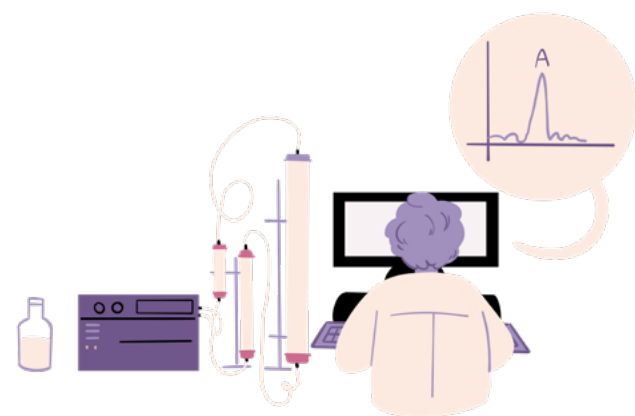
17. Corte de flores (baixo)



## Proteases Aspárticas

Os pistilos de *C. cardunculus* expressam diversos tipos de Proteases Aspárticas (PA) típicas. Várias PA foram purificadas e caracterizadas designadamente, as cardosinas A e B e ciprosinas 1, 2 e 3. Posteriormente, foram isoladas mais as cardosinas, C e D que compartilham, com a cardosina A, uma elevada semelhança na sequência. Mais recentemente, a *C. cardunculus*, com a purificação de mais quatro cardosinas (E-H) tornou-se, com um total de nove, um dos organismos com o número mais elevado de PA isoladas. Esta multiplicidade de PA, numa espécie, reflete a presença de uma família multigénica constituída por genes distintos, complementada por modificações pós tradução, que desempenham funções biológicas específicas no espaço e no tempo. A tipologia deste grupo de PA sugere que, em algum momento da evolução de *C. cardunculus*, um gene ancestral das PA terá duplicado e originado as ciprosinas e cardosinas.

Todas as PA típicas de plantas da família A1, independentemente do grau de homologia na sequência, são sintetizadas numa forma precursora de zimógeno e apresentam uma organização estrutural dos domínios bem conservada. Os domínios característicos das proenzimas incluem: Péptido sinal de natureza hidrofóbica, responsável pelo endereçamento para o lúmen do retículo endoplasmático (RE);



19. Separação das cardosinas / cromatografia (cima)

20. Visualização das cardosinas / eletroforese (baixo)

Sequência pró, envolvida na inativação do precursor; Domínio N-terminal que na enzima madura corresponde à cadeia pesada; Domínio C-terminal, a cadeia leve da enzima madura; PSI (*Plant Specific Insert*) inserção entre os domínios N-terminal e C-terminal.

As cardosinas A e B são enzimas diméricas, glicosiladas que, apesar de apresentarem elevada homologia ao nível das sequências de nucleótidos e de aminoácidos, são dirigidas para distintos compartimentos celulares na flor. A cardosina A é formada por duas subunidades com pesos moleculares de 31 e 15 kDa e a cardosina B por duas subunidades de 34 e 14 kDa. Em termos de especificidade e atividade as cardosinas A e B são semelhantes à quimosina e pepsina, respetivamente.

As cardosinas E, F, G e H, presentes nos pistilos de *C. cardunculus*, possuem duas subunidades com pesos moleculares de 29 e 15 kDa. Estas enzimas assemelham-se mais à cardosina A do que à cardosina B e exibem distintas atividades e especificidades. A cardosinas G é mais ativa que a cardosina A, com a cardosina E a exibir uma especificidade distinta e a F uma menor atividade.

Na evolução das PA nas plantas tornou-se evidente que a perda do mecanismo de inativação nas formas precursoras terá ocorrido, provavelmente, antes da

duplicação do gene ancestral comum às cardosinas e ciprosinas, o que poderá explicar a atividade enzimática de procarnosinas em algumas formas recombinantes.

A cardosina A, em *C. cardunculus*, é sintetizada como uma preproenzima de 66 kDa que é translocada para o RE, onde o peptídeo sinal é excisado e a proteína torna-se glicosilada em dois locais. Ambos, são ocupados por oligossacarídeos predominantemente resistentes à remoção por endoglicosidase H, indicando um processamento anterior ao Golgi. A cardosina B apresenta, igualmente, dois locais putativos de N-glicosilação (Asn138 e Asn252), mas que são sensíveis à digestão por endoglicosidase-H. Estes padrões de glicosilação implicam que os glicanos tenham níveis elevados de manose acessíveis às enzimas de processamento do Golgi. O facto de os locais de glicosilação não estarem nos centros ativos sugere que não sejam fundamentais para a actividade e especificidade da enzima. Contudo, podem desempenhar um papel importante no enrolamento e estabilidade da enzima.



21. Proteases aspárticas

## Biotecnologia do Queijo

A ação de proteólise desenvolvida, na coagulação e ao longo da maturação, pelo extrato coagulante e a evolução do teor de humidade nos queijos ao longo da maturação, em combinação com a ação promovida pelos microrganismos, condicionam em larga medida as características físico-químicas, de cor e textura dos queijos. Contudo, a ação ao longo da maturação depende, em larga medida, da concentração e do tipo de cardosinas que não saíram na sinérese juntamente com o soro e que permaneceram na matriz do queijo. Os queijos que, no final do período de maturação, apresentaram maiores teores de humidade, registaram os menores teores em proteína e cinzas e vice-versa. Estes resultados confirmam a influência que as flores de cardo, usadas na preparação do extrato coagulante, podem ter nas características do queijo Serra da Estrela.



22. Etapa de preparação do coagulante

Na queijaria #P2 foi realizado um outro conjunto de ensaios de produção de queijo Serra da Estrela DOP com flores selecionadas de três genótipos distintos (3M, 5M e 6M) no âmbito do projeto iCHEESE. Para esta produção, foi utilizado um lote de leite cru de ovelha da raça “Serra da Estrela” com a seguinte composição: Gordura total (%): 8,1; Proteína total (%): 5,3; Matéria seca (%): 17,1; pH: 6,7; acidez (mL NaOH L<sup>-1</sup>): 27,5. Todo o processo de preparação do extrato e coagulação foi monitorizado e registados os tempos de coagulação e volume de soro com uma maior libertação de soro no genótipo 3M comparativamente com os restantes. Após 45 dias de maturação, foram avaliadas as texturas dos queijos. O genótipo 3M apresentou uma maior firmeza da crosta (5,25 N), menor firmeza da pasta (1,07 N) e uma maior aderência (-1,50 N) e adesividade (-11,01 N s). Pelo contrário, o genótipo 5M revelou o queijo com menor aderência (-0,9 N) e adesividade (-4,5 N) e o 6M a firmeza da pasta mais elevada (1,5 N). A firmeza da casca é uma característica importante na contenção da pasta, atendendo ao carácter amanteigado deste tipo de queijo e que pode ser muito influenciada pelas características da câmara de cura nos processos de maturação e utilização de salga mista para promover um maior encasamento.



23. Ovelha raça Serra da Estrela

As flores de cardo, pela relevância que têm para a produção do QSE, foram o material biológico caracterizado de forma mais extensiva. Um dos resultados mais relevantes, nos recursos genéticos caracterizados, foi a identificação de flores cujos perfis bioquímicos apresentaram distintas composições em cardosinas. A cardosina A foi a que registou uma maior variação entre formas processadas e não processadas. O genótipo 6M apresentou toda a cardosina A completamente processada ao contrário dos restantes genótipos que revelaram as formas não processadas em diferentes concentrações. Por outro lado, a cardosina B apresentou uma menor concentração, embora com clara prevalência de formas processadas relativamente às não processadas.

A concentração de cardosinas totais nos extratos variou em função da especificidade bioquímica da flor e pela proporção entre as peças florais que compõem o pistilo designadamente, o estigma e os elementos do cálice e corola. Em perfis bioquímicos obtidos de flores de uma mesma planta comparando, flores completas e apenas estigmas, nas cardosinas A0 e A, registou-se um aumento na concentração destas cardosinas, sensivelmente para o dobro, enquanto na cardosina B o aumento foi de 20 %. Deste modo, usando flores de uma mesma planta com um perfil bioquímico específico, podemos obter concentrações muito distintas em função da parte da flor utilizada, em função do tipo de corte realizado.



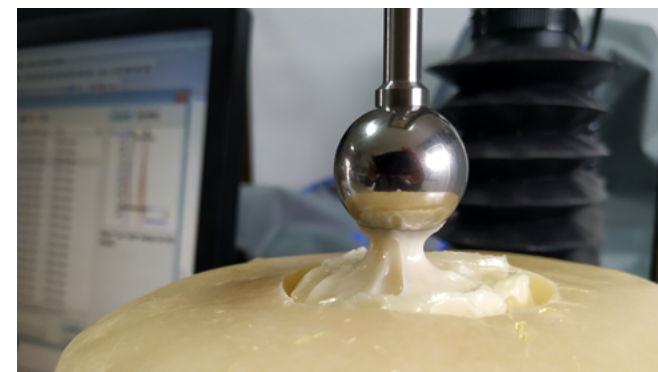
A variação entre perfis bioquímicos de flores frescas e secas, obtidos das mesmas plantas, suscitou o possível interesse na utilização de flores frescas, congeladas de imediato, na preparação do extrato para a produção de queijo. Esta situação poderá trazer algumas vantagens em relação à rentabilização da flor de cardo colhida, porque no processo de secagem perde-se cerca de 50% do peso da flor. Contudo, a maior vantagem na utilização de flor fresca será conseguir triturar-se completamente o material vegetal e, com isso obter uma maior concentração de cardosinas, em particular, a cardosina B, proporcionalmente, em maior quantidade na região interior do pistilo.

A eletroforese nativa realizada a partir de extratos obtidos da flor revelou-se uma técnica adequada para a caracterização sumária do perfil bioquímico relativo à diversidade das cardosinas, designadamente em relação à presença e concentração das formas não processadas e das formas ativas de cardosinas A0, A e B.



24. Pistilos

Nos ensaios desenvolvidos em queijarias foram usadas flores com perfis bioquímicos distintos, na relação entre formas processadas e não processadas de cardosina A. Com a seleção destes perfis pretendeu-se estimar a influência que as flores de cardo podem ter num mesmo tipo de leite e procedimento de fabrico. As flores de cardo com elevada prevalência de cardosina A, completamente processada produziram queijos com maior homogeneidade e firmeza da pasta e menores teores de amargores. Pelo contrário, flores sem cardosina A, completamente processada, devido à predominância de outras cardosinas, nomeadamente A0 e B produziram queijos com uma menor firmeza da pasta, maior aderência e adesividade e uma maior perceção nos teores de amargores fruto de uma ação proteolítica mais intensa. Entre estes perfis bioquímicos considerados extremos, para a diversidade bioquímica avaliada, foram encontrados outros perfis bioquímicos que produziram queijos com características e texturas intermédias. Os resultados sugerem que, apesar da quantidade reduzida de flor cardo usada no QSE DOP, esta pode ter uma influência decisiva na proteólise ocorrida nas fases de coagulação e maturação e, consequentemente, nas características físico-químicas e organoléticas dos queijos. Em lotes padronizados de leite, o tipo de flor de cardo pode afetar os parâmetros de textura, cor da casca e composição química do queijo, em particular os teores de gordura e proteína.



25, 26, 27. Análise de queijo

A diversidade encontrada na composição de cardosinas nas flores de diferentes genótipos constitui um desafio para a obtenção de material vegetal certificado com um perfil bioquímico de flores específico. Cada genótipo manteve a composição bioquímica das suas flores, no período normal de colheita, durante os vários anos de estudo. Contudo, não se observou qualquer relação entre a morfologia das plantas e a bioquímica das flores.

A relação encontrada entre o genótipo

e a bioquímica das flores permite obter vegetativamente, a partir de material vegetal da planta original, novas plantas com garantia de manutenção dos perfis bioquímicos. Uma outra forma de obtenção de plantas é por semente que, sendo a mais fácil, poderá não assegurar, em absoluto, o perfil bioquímico das flores da planta-mãe. As sementes obtidas naturalmente, provenientes de plantas com genótipos específicos, podem apresentar uma elevada biodiversidade, devido à estratégia de polinização cruzada. Contudo, através do melhoramento com recurso a plantas com esterilidade masculina poderemos realizar cruzamentos controlados para virmos a obter aquénios com as características bioquímicas e morfológicas pretendidas.

Com este estudo pretendemos promover a produção de lotes de flor, com distintos perfis proteolíticos, devidamente padronizados e com qualidade alimentar, dando cumprimento às exigências comunitárias relativas à aplicação do Regulamento (CE) Nº 1332/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2008, que visa a harmonização das disposições legais relativamente à utilização de enzimas nos géneros alimentícios. A diversidade morfológica, bioquímica e o potencial biotecnológico apresentados neste estudo reforçam uma estratégia, para a região Centro, que deve apostar num incentivo ao setor agrícola para instalação de campos de cardo, que proporcionem autonomia de flor de cardo para as fileiras dos Queijo do Centro e, simultaneamente, produzam diferentes formas de biomassa que possam ser valorizadas nas diversas indústrias sediadas na região.



## COLHEITA DA FLOR DE CARDO

A colheita da flor é um dos processos onde ainda existe uma grande evolução a realizar. Para valorizarmos e potenciarmos as aplicações das flores de cardo, devemos conhecer a variabilidade das cardosinas, no tipo e na concentração, entre flores e na mesma flor. Este conhecimento é fundamental para determinarmos as melhores práticas de colheita da flor. Replicar os procedimentos que são usados tradicionalmente, ainda que de forma mais pormenorizada, são aqueles que de uma forma direta nos permitem olhar mais longe para agirmos mais perto na valorização do território.

As flores de cardo estão inseridas em capítulos, sendo formadas pelo estigma de cor arroxeadada, o estilete branco e o tubo floral composto pela corola e estames. A forma de corte da flor é determinante para a qualidade da flor.

A caracterização bioquímica relativa ao tipo de perfil bioquímico e concentração das cardosinas, foi avaliado nos diversos componentes da flor, designadamente no estigma, estilete e nas restantes estruturas florais que incluem o cálice, a corola, os estames e o pólen.

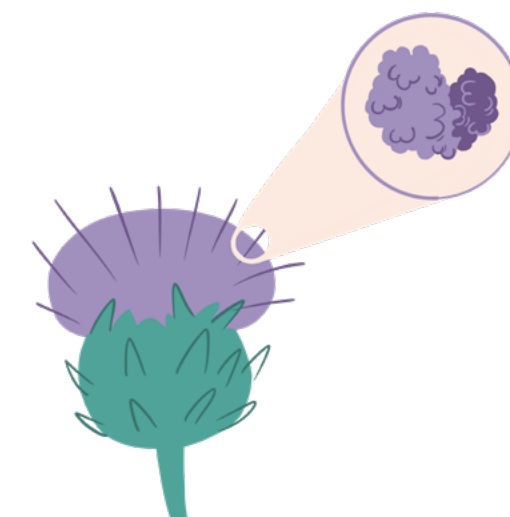
Em flores completas com estilete e estigma de uma mesma inflorescência na mesma planta (4M) preparamos três amostras distintas: a) flor completa (estigma e estilete); b) estigma da flor (cor arroxeadada); c) estilete da flor (cor branca). Pela análise comparativa dos cromatogramas da troca iónica nas três

amostras podemos observar o grupo das cardosinas A0, A e B, respetivamente. Comparando o perfil obtido da amostra das flores completas com o da amostra dos estigmas, podemos observar que nas cardosinas A0 e da cardosina A, regista-se um aumento para valores ligeiramente superiores ao dobro. A cardosina B revela um aumento apenas de cerca de 20 %. Podemos ainda verificar que a contribuição da parte inferior da flor (estilete), em termos de concentração de cardosinas, é praticamente insignificante. Para obtermos um conhecimento mais pormenorizado sobre a variação do perfil bioquímico em flores devidamente caracterizadas, preparamos a partir dos estigmas das mesmas flores três amostras distintas designadamente o estigma completo, a epiderme púrpura papilosa (arroxeadada) e o tecido fibroso interno (branco) que corresponde ao prolongamento do estilete e que representam, em média, 95% e 5% do peso total da amostra, respetivamente.

Aparentemente, o mesmo tipos de cardosinas, estão presentes em ambas as estruturas das flores. Este facto poderá significar que, no estigma, os diferentes tipos de cardosinas conseguem migrar da epiderme exterior para o tecido fibroso interno da flor. Sabemos que o tecido fibroso interno do estigma pode ter uma importante contribuição na concentração total de cardosinas. Por isso, devemos maximizar o rendimento de extração de cardosinas macerando bem esse

material durante a preparação do extrato. Este processo consegue-se realizar de um modo claramente mais eficiente em flores frescas comparativamente com as secas. Daí a importância de se fazer evoluir o procedimento de obtenção do extrato no intuito de se maximizar o rendimento da flor e consequentemente a qualidade do extrato. Para adequarmos novos procedimentos, analisamos flores de cardo usadas por produtores da região para estimar o rendimento em cada uma das componentes da flor, estigma com uma pequena parte de estilete incorporada e a porção relativa ao cálice, corola e estames de tonalidade acastanhada. Das flores analisadas o estigma representou 44,6% do peso total da flor os restantes componentes da flor seca 55,4%.

A colheita da flor é realizada, geralmente, entre junho a agosto, dependendo da localização, ano e variedade. Geralmente, é realizada manualmente embora existam alguns desenvolvimentos na colheita com alguns equipamentos de corte elétricos que podem facilitar a colheita. O processo tradicional de secagem das flores é realizado à temperatura ambiente (25-30°C) com desidratação por um período de 30 a 60 dias. As flores são colhidas ao longo do período de floração e colocadas a secar à temperatura ambiente, protegidas da luz solar direta com movimentações regulares do material para evitar que o excesso de humidade possa promover fermentações indesejáveis e o desenvolvimento de fungos e bactérias. A atividade média de coagulação do leite de flores secas e frescas é sensivelmente semelhante, embora possam ser registadas perdas de 20 a 50% quando expresso em base seca ou em nitrogénio total. É possível realizar



28. Pistilos (cima)

29. Cardosina (baixo)

uma desidratação a temperaturas um pouco mais elevadas com ar forçado com uma diminuição do tempo de secagem e reduzindo as perdas de atividade. A secagem a 50 °C durante 7 dias a média de MCA na matéria seca é claramente superior (35%). A 55°C durante 5 dias foi cerca de 17% maior e a 100 °C durante 5 h registou uma perda de 5% do MCA. Após 300 dias de armazenamento das flores secas a 25 °C, foram registadas perdas de 35% do MCA original, idêntico à perda após armazenamento a 4 °C durante 150 dias.

## PREPARAÇÃO DO EXTRATO

O protocolo de preparação do extrato deve considerar diversas variáveis, que incluem composição e o pH de tampões de extração.

A mecanização do processo para maximizar a extração é um procedimento determinante para otimizar a rentabilidade da extração. Uma outra fase importante será a higienização do extrato. É importante perceber se as flores poderão apresentar formas de cardosinas que não se estejam completamente processadas e que possa ser possível ativar no decurso da preparação do extrato.

O conhecimento da diversidade bioquímica das flores de cardos, ao nível das enzimas coagulantes e dos compostos bioativos, permitirá o desenvolvimento de perfis de texturas que respondam aos requisitos pretendidos não apenas na produção de queijos DOP tradicionais, mas igualmente na perspetiva de formas de queijos inovadoras. As características das flores são determinantes para o sucesso na preparação do extrato. Normalmente são usadas flores secas, embora defendamos que se possa realizar com flores frescas ou congeladas como forma de otimizar o procedimento. A forma de corte pode ser igualmente determinante para uma melhor rentabilização.

O processamento das cardosinas pode ser realizado através da acidificação do meio durante algumas horas. Este conhecimento pode estar diretamente relacionado com a prática comum

ancestral de deixar as flores após maceração em solução durante algumas horas como forma de incrementar a atividade coagulante do extrato. A solução usada como meio de extração é outro dos elementos que deve ser analisado em pormenor, assim como a adição de sal na sua preparação para baixar o pH e aumentar a força iónica.

O tempo de contacto das flores com a solução depende das queijarias e do tipo de flores. Todos estes procedimentos podem apresentar variantes, designadamente a introdução de sal logo na extração que em primeiro lugar pode funcionar como elemento abrasivo, podendo, contudo, ter uma ação de estabilização das enzimas e facilitação do rebentamento das células da flor, facilitando a extração da enzima.

A escolha do procedimento de extração apesar de ser um dos primeiros passos da laboração constitui uma etapa fundamental para o sucesso no resultado final do processo de fabrico do queijo que utilize o cardo como coalho vegetal.

A extração deve procurar responder a várias questões que se prendem com otimizar ao máximo a extração de enzimas e que estas estejam efetivamente em formas processadas e ativas. Por outro lado, devemos saber a quantidade total de cardosinas que estamos a adicionar, sendo que podemos ter proporções distintas nas diferentes formas presentes (A, A0 e B) e uma parte das enzimas que pode

efetivamente não estar ativa e desenvolver o procedimento de coagulação.

Uma das vantagens dos extratos de flor de cardo deve-se à possibilidade de apresentarem compostos fenólicos e flavonoides que sendo bioativos podem adicionar funcionalidade ao extrato e ao queijo.

Está estabelecido que a quantidade máxima de flor usada na preparação dos extratos deverá ser 0,3 g L de leite embora possa existir a necessidade de se usarem valores superiores o que pode significar que temos vindo a assistir a uma perda de qualidade da flor.

Preparação de extratos não padronizados podem variar em termos de atividade de coagulação e proteolíticas, influenciando o rendimento de produção e as propriedades do queijo.

A extração em condições ácidas (pH 3,0) resultam num extrato com maior atividade proteolítica em comparação com a extração em pHs superiores a 5,5 que é o pH que normalmente se obtém quando se extrai as flores com água. Os resultados sugerem que o pH do tampão de extração afeta significativamente as propriedades das enzimas, permitem a obtenção de extratos mais purificados e pigmentos menos oxidados. Pode ainda favorecer o a ativação de formas precursoras que possam existir.

A adição de sal na preparação do extrato pode reduzir o valor de pH (4,4).

Os extratos brutos de flores de cardo preparados a diferentes pHs, podem exibir distintos conteúdos enzimáticos e atividades produzindo géis com diferentes firmezas, propriedades reológicas e capacidade de retenção de água. A redução do pH contribuiu para o aumento da razão

MCA/PA (ação coagulante/atividade proteolítica) e percentagem de enzimas extraídas. Muito provavelmente um extrato de pH 3 é mais efetivo na ativação da cardosina A ou formas equivalentes de A0 promovendo uma maior especificidade na proteólise. Os extratos de flores secas em queijaria são preparados diariamente. O modo de preparação com varinha mágica pode formar, normalmente, uma espuma abundante que interessa avaliar se resulta de alguma desnaturação de enzimas. O objetivo é procurar atingir a máxima eficácia na extração do conteúdo enzimático das flores.

30. Adição de sal na preparação do extrato (cima)

31. Pistilo macerado (baixo)







32. Extrato de cardo

Alguns produtores usam água morna para maximizar a extração. Outros produtores fazem a extração de um dia para o outro procurando maximizar a capacidade de extração, podendo ser benéfica alguma agitação e a adição de sal para aumentar a força iônica e limitar o crescimento microbiano.

A coloração acastanhada do extrato é o resultado da contaminação com compostos fenólicos de outros componentes florais não relevantes para a produção de queijos que podem afetar a atividade enzimática e dificultar processos de purificação e concentração.

Estas soluções podem ser armazenadas a 4 °C com algumas perdas no MCA que podem atingir 65% após quatro semanas, maior do que para extratos liofilizados

(35%). Curiosamente após uma semana as perdas de atividade tenham sido menores para extratos frescos (23%) comparativamente com extratos liofilizados (44-61%). Pode ser devido a algum eventual processamento de algumas formas de cardosinas com o tempo. A perda de MCA de extratos aquosos após 90 dias de armazenamento foi na ordem do 27-40%. Estas perdas são semelhantes às registradas com a conservação das flores, o que parece indicar a possibilidade de considerar a preservação dos extratos a 4 C, permitindo a disponibilidade de soluções padrão líquidas para uso na produção de queijos.

Devemos encontrar formulações adequadas para melhor preservar e explorar o potencial proteolítico do

coagulante de flor de cardo.

Para além do cardo (*Cynara cardunculus*) outras espécies da família Asteraceae têm sido usadas na produção de queijos. A alcachofra (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) possui uma cardosina que revela uma homologia de 96% com a cardosina A do cardo. A atividade proteolítica foi máxima a pH 5,0 e uma baixa estabilidade térmica (45-50°C). Esta característica pode ser vantajosa no fabrico de alguns queijos onde a alta termoestabilidade é uma desvantagem, o que significa que mesmo após o cozimento da coalhada, a enzima permanece ativa e causa maturação dos queijos. O *Cynara humilis* apresenta exclusivamente cardosina A, revelando por esse facto uma proteólise menos extensa comparativamente com a *C. cardunculus*.

O *Onopordum turcicum* apresenta um complexo enzimático em sementes, folhas e flores com 19 a 24 kDa com uma atividade máxima a 55 C e uma razão entre atividade de coagulação do leite/ atividade proteolítica cerca de cinco vezes inferior ao coalho animal. O *Onopordum acanthium* possui uma onopordosina nas flores com 45 kDa e uma atividade máxima a pH 2. O queijo apresentou um sabor levemente amargo, alguma flutuação, um sabor de maturação intenso e característico.

A *Centaurea calcitrapa* apresenta cenprosinas em todas as partes da planta, particularmente nas flores. A cenprosinas é produzida numa forma não processada que sofre modificações proteolíticas pós-tradução formando duas subunidades com 30 e 16 kDa. Apresentam uma atividade máxima a pH 3,5 e 5,1 e a temperatura ideal é de 52 C. Apresenta uma homologia de 75% de identidade com a cardosina A da *Cynara cardunculus*.

O cardo mariano (*Sylibum marianum*) possui uma protease dimérica com duas subunidades com 19 e 13 kDa e atividade coagulante máxima a pH 3,8. O *Cirsium vulgare* possui uma protease aspártica denominada cirsina que apresenta maior atividade a uma temperatura de 30-37 C e a pH 4. Esta protease, ao contrário das restantes, parece ser ativa na forma não processada ainda com o prosegmento.



# PRODUÇÃO DO QUEIJO

A conversão do leite em queijo compreende transformações bioquímicas e biotecnológicas que ocorrem em fases distintas, entre as quais se destacam: a coagulação do leite por ação de enzimas proteolíticas e acidificação, a fermentação realizada pela ação de bactérias, para além de procedimentos como o corte da coalhada, a sinérese, a moldagem, a salga e a cura.

O QSE foi o primeiro queijo tradicional português de ovelha com região de denominação de origem, criada em 1985.

Na formação da coalhada alguns componentes do leite, onde se incluem uma grande parte das caseínas e componentes da gordura, ficam retidos e concentrados, enquanto outros são libertados juntamente com a água constituindo o soro. O rendimento e a composição final do queijo dependem das características do leite, sobretudo da sua composição química (proteínas e gorduras), composição da flora microbiana do leite cru e inteiro, dos agentes coagulantes e dos processos de produção e maturação.

33. Coalhada



34. Coalhada

Nos países do mediterrâneo, os queijos feitos com leite cru de pequenos ruminantes são apreciados pelos consumidores pelos sabor, textura e tipicidade associadas a um produto natural, alguns deles com denominação de origem protegida aos quais se aplicam medidas rigorosas de controle de higiene e qualidade. A microflora indígena associada ao leite cru e inteiro, constituída essencialmente por bactérias lácticas pertencentes aos géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, bactérias da família *Enterobacteriaceae* e leveduras, desempenha um papel de extrema importância no processo de maturação e no desenvolvimento das características sensoriais. Existem algumas bactérias e fungos que podem encontrar-se nas câmaras de cura ou ser introduzidas durante o processo de fabrico, através dos extratos obtidos pelas flores ou no manuseamento.

Controlar as comunidades microbianas durante a produção de queijo é o principal fator para garantir a segurança alimentar e as propriedades sensoriais do produto final. A ação de proteólise desenvolvida, na coagulação e ao longo da maturação, pelo extrato coagulante e a evolução do teor de humidade nos queijos ao longo da maturação, em combinação com a ação promovida pelos microrganismos, condicionam em larga medida as características físico-químicas,

de cor e textura dos queijos.

As flores do cardo com uma quantidade limitada de cardosina A completamente processada promovem uma maior libertação do volume de soro de leite durante a sinérese e a textura final da matriz de queijo é a mais amanteigada entre as flores utilizadas. O volume de soro de leite na sinérese proveniente da ação de coagulação pode depender de vários fatores.

A coagulação do leite é a etapa essencial no processo de produção de queijos e na qual os coagulantes desempenham um papel fundamental.

A origem da enzima utilizada, animal, vegetal ou microbiana, a sua concentração e especificidade bioquímica podem ser responsáveis pelo tempo de coagulação, propriedades de drenagem e reológicas da coalhada e o rendimento queijeiro, condicionando o teor de humidade e as características na textura, químicas, sensoriais e organoléticas do queijo.



A ação do coagulante sobre o leite é o resultado de quatro fenômenos distintos que se sobrepõem e podem causar sinergias:

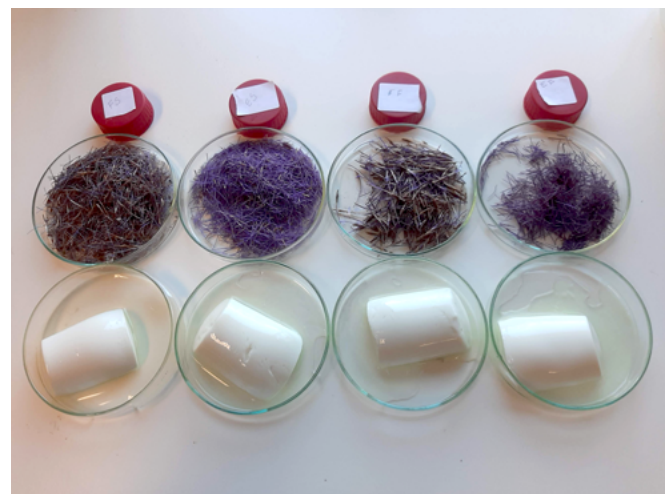
- hidrólise da  $\kappa$ -caseína que causa a desestabilização das micelas de caseínas;
- agregação das micelas de caseínas desestabilizadas;
- gelificação;
- libertação do soro (sinérese).

A maturação tem um papel fundamental no desenvolvimento das características físico-químicas, organoléticas e texturais do queijo. Nesta fase, ocorrem uma série de processos bioquímicos (proteólise, lipólise e glicólise) e microbiológicos, que determinarão as características finais do queijo.

A maturação é influenciada, principalmente, pela temperatura e humidade das salas de cura e composição química da coalhada, designadamente pH,  $a_w$  (com relevância para a relação teor em sal/humidade) e conteúdo em gordura, proteína, lactose, aminoácidos, ácidos gordos e outros produtos resultantes da ação enzimática.

A humidade influencia a concentração dos solutos e a taxa de crescimento microbiano, que também é determinada pelo pH da coalhada, pela presença de substâncias inibitórias e pelo potencial de oxidação-redução. A extensão da proteólise dependerá da ação enzimática proveniente do coalho e da microflora nativa associada ao leite, quer por ação dos próprios microrganismos, quer pelas enzimas libertadas após lise celular.

Grande parte da lactose (dissacarídeo de glicose e galactose) é extraída com o soro durante a produção de queijo, apesar de permanecer, sempre, uma quantidade



35. Coagulação

residual dissolvida no soro existente na matriz da coalhada.

A glicólise é sumariamente o processo de transformação dos açúcares em ácido pirúvico e, posteriormente, em ácido láctico. A acidificação do meio, tem um efeito importante na estrutura da matriz proteica, por via da desmineralização das micelas de caseína. Isto acontece sobretudo nas primeiras fases da maturação, sendo que a partir de certa altura deixa de haver substrato e, portanto, a glicólise é muito reduzida. De modo inverso surge o catabolismo do lactato originando diversos outros ácidos orgânicos (acético, cítrico, propiónico, butírico, iso-valérico, entre outros). Apesar de, aparentemente, se dar uma maior importância à proteólise e à lipólise, sob ponto de vista gustativo e até olfativo, o catabolismo do lactato é determinante no sabor do queijo. Para além das bactérias lácticas, existem outros microrganismos capazes de fermentar os monossacarídeos de lactose e transformá-los em diversos produtos, que podem ser indesejáveis e originar defeitos nos queijos. O ácido láctico também pode sofrer modificações combinando-se com o cálcio

do soro para formar lactato e, dependendo do tipo de queijo, o lactato e o ácido láctico podem ser transformados em ácido propiónico, acético e dióxido de carbono.

A lipólise é um importante mecanismo bioquímico que ocorre durante a maturação do queijo, sendo uma das vias de promoção de sabor no queijo. Os ácidos gordos livres são importantes precursores de reações metabólicas, que produzem compostos voláteis e contribuem para o sabor. Por isso a gordura do leite é um dos componentes fundamentais que determinam a qualidade do queijo por via da reologia, textura e sabor. A hidrólise da gordura do leite liberta ácidos gordos de cadeia curta (C4-C10) que proporcionam sabores característicos para uma variedade de queijos. As bactérias ácido lácticas (BAL) possuem enzimas esterolíticas e lipolíticas mas são geralmente consideradas debilmente lipolíticas em comparação com outras espécies como *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Flavobacterium*. Contudo, por existirem em elevada quantidade ao longo da maturação são provavelmente as principais responsáveis pela libertação de níveis significativos de ácidos gordos livres.

O uso do coalho de *Cynara cardunculus* promove uma melhoria na lipólise nos queijos que aumenta com a maturação, que pode ser promovido pela atividade lipolítica inerente às enzimas proteolíticas.

Os queijos produzidos com cardo apresentam maiores teores de gordura pelo facto de terem uma maior capacidade de reterem componentes gordos na coalhada que pode explicar a textura mais fina e untuosa.

Tem-se vindo a registar uma tendência generalizada na redução da quantidade de

sal que é adicionada no fabrico, contudo existe uma variabilidade em função do produtor.

Os péptidos derivados de proteínas do leite exercem várias atividades de promoção de saúde. Os péptidos antitrombóticos, antioxidantes, anti-hipertensivos e hipocolesterolémicos podem promover benefícios ao nível do sistema cardiovascular. Os péptidos que desempenham a função de imunomoduladores, citomoduladores e antimicrobianos beneficiem o sistema imunitário e, ainda, os péptidos opióides no sistema nervoso. A retenção de peptídeos na coalhada devido à sua elevada hidrofobicidade, pode contribuir para um sabor amargo.

Um dos parâmetros a ser considerado na escolha de um agente coagulante é o rendimento em peso de queijo. A maioria dos coalhos vegetais pode ter alguma quebra no rendimento.

Contudo no QSE pela escolha do cardo determinada pela qualidade excepcional no queijo levou a que a genialidade humana procurasse compensar alguma perda com

36. Produção de queijo





o aproveitamento do soro na produção de um segundo produto o requeijão que passou a ter um papel preponderante no rendimento da queijaria para além de ser a “caixa diária” da queijaria e de ser necessária uma grande mestria para produzir um produto de qualidade excecional.

Para queijos, em geral, uma protease com uma razão superior entre a atividade específica de coagulação do leite (MCA) e a atividade proteolítica inespecífica (PA) proporciona uma coalhada com maior rendimento queijeiro e menor índice de amargor. Na razão inversa a coalhada pode apresentar uma firmeza mais fraca e uma libertação de péptidos amargos que afetam as propriedades sensoriais do produto.

A intensidade e o tipo de amargor podem ser uma opção de identidade dentro de determinados limites para certos tipos de consumidores e culturas. Inclusivamente em combinação com outros alimentos ou bebidas podem criar sensações exclusivas. Podem ainda, derivar de compostos bioativos que tenham um papel determinante na promoção de saúde.

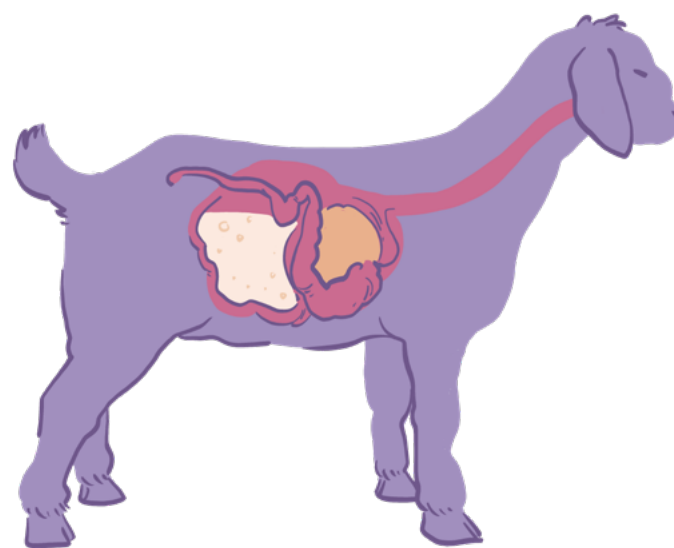
Extratos preparados em pH 3 apresentam as melhores propriedades de coagulação do leite (MCA/PA). A avaliação do pH dos extratos pode revelar-se um ótimo indicador para se poder perspetivar o potencial de coagulação do extrato, parecendo estar diretamente relacionado com a concentração total de cardosinas.

A maioria da fração de azoto solúvel em água (WSN)

do Queijo Serra da Estrela é uma solução muito heterogénea derivado da quebra das caseínas do leite de ovelha promovidos pelas cardosinas que inclui proteínas do soro do leite, peptídeos de alto, médio e baixo peso molecular e aminoácidos livres. No início o rácio WSN/TN foi de 9,5%, aumentando para 29,2% e 36,9% após 21 e 35 dias, respetivamente, embora estes valores possam variar em função da época de maturação.

Em queijos com 42 dias de cura produzidos com leite de ovelha e flor de cardo os valores de WSN/TN, 12%TCA-N/TN e 5%PTAN/TN foram de 42%, 8 e 1%, respetivamente.

O índice de maturação (SN/TN), definido como a percentagem de azoto solúvel (SN) a pH 4,6 por 100 g de azoto total (TN), é usado para mostrar a intensidade da proteólise no queijo. Nos queijos produzidos com coagulantes de cardo os índices são superiores a 30%, como no Los Pedroches (31-37%), Pecorino (45%), Manchego (45-49%). Em queijos Cheddar e Camembert produzidos com extratos de cardo, em comparação com quimosina ou coalho



37. Quimosina ou coalho animal

animal, apresentam valores duas vezes superiores.

O índice TCA-SN/TN, definido como azoto não proteico solúvel em 12% de ácido tricloroacético (TCA-SN) por 100 g de azoto total (TN), é usado para avaliar o papel das peptidases das bactérias do ácido láctico. Umas quebras mais extensas das caseínas por coagulantes de cardo proporcionam uma concentração mais elevada de péptidos que são consumidos como substrato pelas bactérias para produzirem pequenos péptidos que são solúveis em TCA (12%).

As frações de SN e TCA-SN podem ter um papel indireto no sabor dos queijos porque estes péptidos são mais hidrolisados para libertar aminoácidos (FAA) que atuam como precursores de uma variedade de reações catabólicas, resultando na criação de uma diversidade de sabores e aromas voláteis. Queijos produzidos com extratos de cardo apresentam uma concentração superior de ácidos gordos voláteis (AGV) que são os principais compostos voláteis no queijo, em comparação com os produzidos por coalho animal, contribuindo de forma determinante no sabor e aroma de muitas variedades de queijo. Os peptídeos de sabor amargo que são produzidos no queijo como resultado de uma extensa proteólise durante o processo de maturação contêm uma elevada proporção de aminoácidos aromáticos e revelam uma elevada hidrofobicidade. Queijos de leite de ovelha produzidos com flor de cardo, por comparação com os de coalho animal, apresentaram uma maior quantidade de péptidos hidrofóbicos. Contudo, não apresentaram sabores mais amargos provavelmente por estarem mascarados por outros sabores, porque continham níveis mais elevados de

AGV entre outros sabores aromáticos comparativamente com aqueles produzidos com coalho animal.

Uma parte do sabor amargo pode ser atribuído ao péptido formado a partir do final da cadeia da Beta-caseína (f193-209) que é muito hidrofóbico e tem um sabor muito amargo. Contudo, a hidrólise da ligação Leu192-Tyr193 é reduzida na presença de NaCl, diminuindo a produção deste péptido.

A cremosidade dos queijos produzidos com coalho vegetal resulta de uma proteólise intensa que promove o rompimento da rede de caseínas que promove uma estrutura mais homogénea. A ação química da proteólise combinada com a ação física no trabalhar da coalhada promove uma maior rompimento da rede de caseínas e uma maior libertação

38. Produção de queijo certificado







39. Maturação do queijo

de soro na sinérese que pode ajudar na cremosidade da pasta.

O período de maturação do queijo é lento e oneroso, devido aos custos relacionados com o armazenamento. Deste modo, reduzir o tempo de maturação pode ser uma estratégia eficaz, desde que não comprometa a qualidade. Uma forte atividade proteolítica das enzimas pode acelerar o processo de maturação.

Embora algumas proteínas apresentem bioatividade na forma nativa, a hidrólise de proteínas do leite pode aumentar essa bioatividade pela libertação de péptidos com composições específicas. Péptidos obtidos a partir de queijos feitos com coagulantes vegetais foram mais eficientes na atividade antioxidante.

O pH diminui significativamente de 6,45 no dia de fabrico até 5,23 no dia 21 de

cura a partir do qual tende a estabilizar. A diminuição do pH durante a maturação deve-se, principalmente, à conversão da lactose em ácido láctico pelas bactérias que atingem o seu máximo nessa altura.

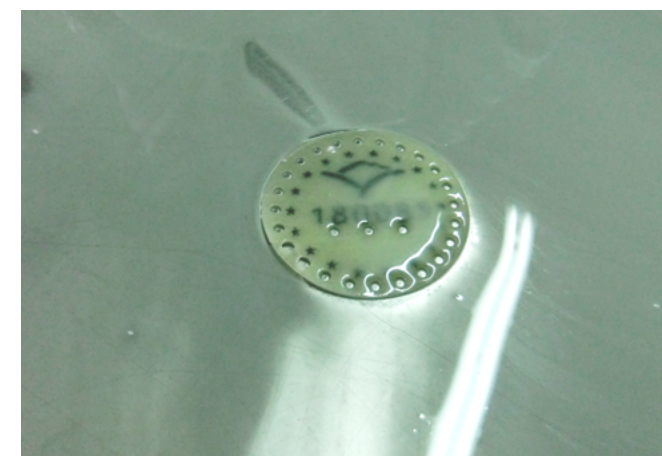
A cura (ou maturação) do Queijo “Serra da Estrela” é composta fundamentalmente por duas fases. Na primeira, com uma duração variável (7 – 15 dias), ocorre a formação da “reima” – um líquido pegajoso e de odor intenso que surge à superfície do queijo – que é sinal de boa fermentação. Os produtores sempre reconheceram esta primeira fase como muito importante e delicada, procurando dispensar a maior atenção possível aos queijos, através de cuidados como as lavagens, as viragens ou as mudanças de “panos”.



40. Queijos curados (cima)

41. Certificação (esquerda cima)

42. Queijo (esquerda baixo)





# FICHA TÉCNICA



**Texto:**  
Paulo Barracosa

**Design Gráfico:**  
Lina Dantas

**Ilustrações:**  
Lina Dantas  
Sara Bairinhas  
Sara Costa  
Sara Covelo

**Site:**  
[www.icheese.pt](http://www.icheese.pt)





