



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

MARIA ALVES FONTENELE

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, AVALIAÇÃO
SENSORIAL, PROTEÔMICA E BIOQUÍMICA DO QUEIJO
COALHO DO JAGUARIBE-CE VISANDO O PROCESSO DE
INDICAÇÃO GEOGRÁFICA – IG**

**FORTALEZA – CEARÁ
2013**

MARIA ALVES FONTENELE

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, AVALIAÇÃO SENSORIAL, PROTEÔMICA
E BIOQUÍMICA DO QUEIJO COALHO DO JAGUARIBE-CE VISANDO O
PROCESSO DE INDICAÇÃO GEOGRÁFICA – IG

Tese apresentada ao Programa de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia - Renorbio da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Silvio do Egito
Co-Orientadora: Dra. Maria do Socorro Rocha Bastos

FORTALEZA – CEARÁ
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Biblioteca Central Prof. Antônio Martins Filho
Bibliotecário Responsável – Francisco Welton Silva Rios – CRB-3 / 919

F683c Fontenele, Maria Alves
Caracterização físico-química, avaliação sensorial, proteômica e bioquímica do queijo coalho do Jaguaribe-CE visando o processo de indicação geográfica / Maria Alves Fontenele . -- 2013.
CD-ROM. 143 f. : il. (algumas color.) ; 4 ¾ pol.

“CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm)”.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual do Ceará, Rede Nordeste de Biotecnologia, Doutorado em Biotecnologia, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Biotecnologia industrial.
Orientação: Prof. Dr. Antonio Silvio do Egito Vasconcelos.
Co-orientação: Dr.^a Maria do Socorro Rocha Bastos.

1. Peptídeos. 2. Caseínas. 3. Cromatografia. 4. Espectrometria de massa. I. Título.

CDD: 660.6

MARIA ALVES FONTENELE

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, AVALIAÇÃO SENSORIAL, PROTEÔMICA
E BIOQUÍMICA DO QUEIJO COALHO DO JAGUARIBE-CE VISANDO O
PROCESSO DE INDICAÇÃO GEOGRÁFICA – IG

Tese apresentada ao Programa de Doutorado em
Biotecnologia/RENORBIO do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da Universidade
Estadual do Ceará, como requisito parcial para a
obtenção do título de doutor em Biotecnologia
Industrial.

Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.

Aprovada em: ___/___/___.

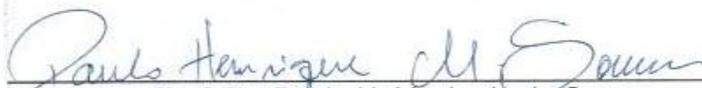
BANCA EXAMINADORA



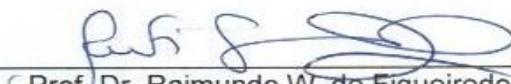
Prof. Dr. Antonio Silvio do Egito (Orientador)
Universidade Estadual do Ceará- UECE/RENORBIO
Embrapa Caprinos e Ovinos – CNPC



Dra. Maria do Socorro Rocha Bastos (Coorientadora)
Embrapa Agroindústria Tropical - CNPAT



Prof. Dr. Paulo H. Machado de Souza
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof. Dr. Raimundo W. de Figueiredo
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira
Universidade de Fortaleza – UNIFOR



Dra. Roselayne Ferro Furtado
Embrapa Agroindústria Tropical - CNPAT

A Deus e toda minha família (Alves e Fontenele)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me amparado em todos os momentos da minha vida, ajudando, orientando e me incentivando a seguir. A ele toda honra e toda glória!

Ao meu Orientador Dr. Antônio Silvio do Egito, pela orientação, dedicação, disponibilidade, paciência e amizade. Egito obrigada, obrigada, obrigada...!

A minha Coorientadora Dra. Maria do Socorro Rocha Bastos pelas oportunidades, por acredita e confiar no meu trabalho, pela disponibilidade e amizade. Socorro muito, muito... obrigada!

Ao pesquisador Dr. Marcelo Porto Bemquerer pela disponibilidade, apoio no sequenciamento dos peptídeos, ensinamentos e colaboração. Marcelo muitíssimo obrigada!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo apoio financeiro deste projeto.

A Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

A Embrapa Agroindústria Tropical em especial aos laboratórios de Fisiologia vegetal, instrumental, microbiologia, biologia molecular, bioprocessos e pós-colheita por todo apoio técnico sem os quais esse trabalho não teria sido realizado.

À Embrapa Caprinos e Ovinos em especial ao laboratório de laticínios pelo apoio técnico.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, na pessoa de Dr. Carlos Bloch, coordenador do Laboratório de espectrometria de massa pelo apoio técnico no sequenciamento dos peptídeos.

Ao Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas – SEBRAE - CE, na pessoa de Vandrei Pires e Maria Elizilde, pelo apoio e colaboração no projeto.

A prefeitura de Jaguaribe, pelo apoio nas coletas.

A associação dos produtores de leite e derivados do Jaguaribe – Queijaribe por colaborar com o projeto.

Aos meus queridos produtores de Jaguaribe que participaram do projeto, José Flávio (Queijo Fazenda Maria Quitéria), Raimundo Miranda (Queijo Grande Rio), Fco. Adelino (Queijo Santana), Fca. Izaína (Queijo Mateus), Anto. Mariano (Queijo da maçã), Alfredo, Marcos Aurélio, Campelo Neto (Queijo Sertanejo), Fco. Regis, Francisco Bezerra, José Bezerra, Bianor de Andrade, Neto do Brum, Ada Maria (Queijo Rio Jaguaribe), Francisco Fabiano (Queijo Irmãos Francisco), Francisco Eudes. Muito obrigada pela doação dos queijos, pelo apoio e disponibilidade durante todo o projeto, pelo carinho que sempre nos recepcionaram e pela amizade.

A Marta Luciana pela colaboração nas coletas em Jaguaribe e pela amizade.

Aos estagiários e bolsistas do projeto queijo que ajudaram nas coletas e análises. Muito obrigada!

Ao meu amigo Wellington Oliveira que foi meu braço direito nas coletas e em algumas análises. Well obrigada pela colaboração, amizade e abraço revitalizador.

A minha grande amiga Ótilia Mônica pelo apoio no desenvolvimento do projeto, companheirismo e amizade. Mônica obrigada por tudo!

A Ionete responsável pelo Laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa pela amizade e colaboração nas análises de eletroforese.

Ao Hilton do Laboratório Instrumental da Embrapa pela colaboração nas análises de HPLC.

A Regia responsável pelo Laboratório de Microbiologia da Embrapa pela colaboração e amizade.

Aos amigos e amigas que ganhei nestes cinco anos de Embrapa Agroindústria Tropical, em especial Amanda, Fábio, Reivane, Alan, Adna, Natalia Lima, Natalia Moura, Hállisom, Daniel, pelos incentivos, companheirismo e amizade. Brigadoo!

Ao Glauber Melo e Adriano Lima (Embrapa Caprinos), pelo apoio nas análises estatísticas.

Aos funcionários da Embrapa Agroindústria Tropical em especial Débora, Dona Fátima, Edneide, Emilson Rocha, Evandir, Francisca, Marcia, Margarete, Nilton, Nédio e Valmir. Obrigada pelo apoio, respeito e amizade.

Ao seu Edilson, por nos trazer em segurança a cada viagem para coleta de queijo.

A Kenya Christina, Dra. Ana Rybka pelo apoio na realização de análises de HPLC.

Ao Benoit Paquereau pela colaboração na avaliação sensorial do queijo e amizade.

As amigas e irmãs de coração Daniele Sales, Adriana Crispim e Ticiane Lima pelo apoio, companheirismo e eterna amizade.

Ao meu eterno orientador Prof. Dr. Frederico José Bezerra, pelo aprendizado, apoio e amizade. Adoro você!

Ao grande e maravilhoso Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa, pelo apoio, disponibilidade e amizade. Paulinho muito, muito obrigada!

Ao Pesquisador Dr. Marlos Alves Beserra, pela colaboração, apoio e amizade. Chefe muito obrigada!

A Profa. Dra. Maria do Livramento de Paula, minha mãe técnica e de coração, pelo grande aprendizado pessoal e profissional, apoio, confiança e eterna amizade, muito, muito, muito... obrigada!

A família que ganhei, Dona Fransquinha, seu Expedito, Andressa, Alison e Ana Iris, muito obrigada pela acolhida, sempre disponível em me receber em Sobral. Deus abençoe sempre essa família linda.

As minha amigas Marinalva e Simone pela amizade, solidariedade e companheirismo. Simone muito obrigada pela poita.

Aos meus avos José Antonio, Raimunda de Souza, Manoel Benício e Ana Fontenele (in memorian) pela sabedoria de vida, carinho e amor eterno.

A todos os meus familiares, primos, primas, tias, tios, em especial ao tio Pedro (in memorian) que foi minha fonte de inspiração para vencer tantos obstáculos longe da família e vencer com respeito e dignidade. A todos o meu muito obrigada.

Aos meus "pais adotivos" Edinaldo e Livramento e meus "irmãos" Sávio, Samara e Samuel, pelo apoio e carinho, minha eterna gratidão.

A minha tia e mãe de coração Terezinha, pelo apoio e carinho. Tia amo você!

A minha prima irmã Teresa, pelo apoio incondicional, confiança, companheirismo e eterna amizade. Teresa muito obrigada!

A minha tia e mãe de coração Rita, pelo amor incondicional. Tia amo você!

Aos meus pais João Batista Fontelene e Maria Alves Fontenele, pela confiança e por todo o amor, a minha eterna gratidão. Pai, mãe amo vocês!

Aos meus queridos irmãos: Cândida, Chagas, José Antônio, Edileuza, Edineusa, João Batista, Livramento, Pedro, Manuel, Demétrio, por estarmos sempre juntinhos apesar da distância, pela confiança, companheirismo e por seu grande amor, muito obrigada. Amo muito cada um de vocês!

Aos meus lindíssimos e maravilhosos sobrinhos, Valdete, Valdiane, Vanessa, Rafael, Rogério, Valdeyla, Bruna, Camila, Augusto, Breno, Bruno, Elayne, Samira, Vinícius, Larisse, Ana Laís, Benício (B) e outros que ainda virão, pelo amor incondicional que é maior que qualquer distancia e é sempre renovado pelo sorriso de vocês. Amor eterno é o que sinto por cada um de vocês meus amores.

As minhas cunhadas e cunhados, Navegantes (Nenê), Enilde (Nide), Francisca (Loura), Erilene (Lena), Fátima, Francisco (Chico), Osmar, Moises, pelo apoio, carinho e amizade. Muito obrigada!

Aos meus padrinhos Francisco Rocha (Nenê) e Maria Oliveira, por todo o amor a mim dedicado. Amo vocês!

Ao meu namorado, pelo carinho, companheirismo, apoio e compreensão nos momentos mais difíceis na concretização dessa trajetória. Preto amo você!

A todos os meus amigos e amigas que infelizmente não pude nomeá-los aqui, pois são muitos, graças a Deus, muito obrigada, pelo companheirismo e grande amizade.

“Amai-vos uns aos outros como eu vos amei.”

(Jo 15, 12)

“Em Jaguaribe é assim, tudo acaba em queijo mas o queijo nunca acaba”

RESUMO

Queijo Coalho de Jaguaribe-CE foi estudado durante dois anos, em suas características físico-químicas, sensoriais, bioquímicas e proteômicas como forma de contribuir para autenticidade do produto dado à sua origem geográfica. Os parâmetros físico-químicos observados estão condizentes com a legislação para este produto, sendo classificado como queijo de média umidade, massa semidura e semigordo. Os queijos Coalho da região de Jaguaribe foram avaliados por uma equipe treinada formada por produtores de queijos e mestres queijeiros da região visando identificar os parâmetros sensoriais característicos deste produto. O queijo característico deve apresentar textura flexível, uniforme e de massa lisa após o corte. O formato deve ser redondo, a cor amarelo claro e sabor levemente salgado, com leve acidez. Caracterização eletroforética foi realizada utilizando eletroforeses uni e bidimensional submetidas à coloração de Coomassie e revelação com nitrato de prata, identificando-se o perfil eletroforético característico do queijo Coalho produzido em Jaguaribe, sendo possível observar a presença das caseínas α , β e do peptídeo para-k-CN, entre outros peptídeos. Em decorrência de todos os queijos apresentarem perfis eletroforéticos similares tanto em eletroforeses na presença de SDS como uréia, estas técnicas apresentam potencial para serem utilizadas nos estudos e caracterização da qualidade do queijo Coalho de Jaguaribe principalmente para monitorar possíveis problemas tecnológicos ou mesmo variações na qualidade do leite. Modificações nos perfis eletroforéticos das proteínas, conforme observado com diminuição da α -CN sugere irregularidade no processamento do queijo ou na matéria prima (leite). Caracterização cromatográfica de peptídeos dos queijos utilizando HPLC mostrou perfis semelhantes entre os queijos da região demarcada, sendo, portanto, mais uma técnica com potencial para ser utilizada para monitorar a qualidade do queijo Coalho produzido em Jaguaribe. As condições cromatográficas utilizadas apresentaram boa resolução dos picos referentes aos peptídeos, o que permitiu a identificação e quantificação segura da sequência de aminoácidos destes peptídeos. Vinte e oito picos distintos foram sequenciados por espectrometria de massa com dois picos majoritários retidos a 16.989 e 39.907 minutos. Foram identificados 109 peptídeos diferentes, sendo 71 deles originados da β -caseína, 4 da β_{A2} -caseína, 4 da β_{A3} -caseína, 21 da α_{s1} -caseína, 5 da α_{s2} -caseína e 4 da κ -caseína.

Destes peptídeos, 18 foram identificados como fosforilados sendo um da α_{s1} -CN e 17 obtidos da β -caseína. O peptídeo β -CN (193-209) identificado neste estudo possui propriedades imunomoduladoras, antimicrobiana e anti-hipertensiva. O peptídeo (145-154) a partir da β -caseína possui atividade imunomoduladora. Os peptídeos β -CN (58-72), β -CN (193-202), α_{s1} -CN (1-9), α_{s1} -CN (85-91) apresentaram atividade anti-hipertensiva assim como α_{s2} -CN (189-197) e (96-102) de κ -caseína, enquanto que o peptídeo obtido da α_{s1} -CN (1-23), apresentou atividade imunomoduladora e antimicrobiana. A caracterização analítica aqui relatada contribui para a atribuição de origem geográfica deste queijo tradicional brasileiro, permitindo diferenciar o queijo Coalho de Jaguaribe dos produzidos em outras regiões.

Palavras-chave: Peptídeos. Caseínas. Cromatografia. Espectrometria de massa.

ABSTRACT

Coalho cheese originated from Jaguaribe-CE was investigated for two years in their physico-chemical, sensory, biochemical and proteomics as a way to contribute to the product's authenticity given to their geographic origin. The physico-chemical parameters observed are within the standards for this product, classified as average moisture cheese, semi-hard cheese and medium fat. Cheeses of the region Jaguaribe were evaluated by a trained team formed by producers of cheeses and cheesemakers teachers in the region to identify the sensory parameters characteristic of this product and the final evaluation of this team is that the cheese should provide flexible texture, uniform and smooth dough after cutting, round shape, color light yellow, slightly salty flavor with mild acidity. In electrophoretic characterization performed using one and two dimensional electrophoresis undergoing development and coomassie silver nitrate staining with, the electrophoretic profile was identified Coalho cheese produced in Jaguaribe. It was observed the presence of casein α , β and to the peptide-CN-k among other peptides. As a result of all the cheeses presented electrophoretic profiles similar in both electrophoresis in the presence of SDS and urea these techniques have potential to be used in studies and characterization of the quality of the Jaguaribe Coalho cheese primarily to monitor possible technological problems or even milk quality. Changes in electrophoretic profiles of proteins, as observed with reduced α -CN suggests error in the processing of raw cheese or (milk). The chromatographic characterization of cheeses using HPLC showed similar profiles between cheeses of the region demarcated, and thus more potential technique to monitor the quality of the Coalho cheese produced in Jaguaribe. The chromatographic conditions used showed good resolution of the peaks relating to the peptides, allowing secure identification and quantification of the amino acid sequence of these peptides. Twenty-eight different peaks were sequenced by mass spectrometry peaks with 2 retained the majority 16.989 and 39.907 minutes. 109 different peptides were identified which 71 were derived from β -casein, 4 β A2-casein, 4 β A3-casein, 21 of α s1-casein, 5 of α s2-casein and 4 of K-casein. These peptides, 18 were identified as being phosphorylated in one α s1-CN and 17 obtained from β -casein. The peptide β -CN (193-209) identified in this study has immunomodulatory properties, antimicrobial and antihypertensive. The

peptide (145-154) from the β -casein has immunomodulatory activity. The peptide β -CN (58-72), β -CN (193-202), α s1-CN (1-9), α s1-CN (85-91) have antihypertensive activity as α s2-CN (189 - 197), (96-102) of κ -casein. While the peptide obtained from α S1-CN (1-23), has antimicrobial and immunomodulatory activity. The analytical characterization reported here may be a first step for assigning geographical origin for this traditional Brazilian cheese, allowing the cheese to differentiate Jaguaribe those produced in another region.

Keywords: Peptides. Caseins. Chromatography. Mass spectrometry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros físico-químicos do queijo Coalho da região de Jaguaribe-CE nos anos de 2009 e 2010.	74
Tabela 2	Parâmetros físico-químicos do queijo Coalho da região de Jaguaribe-CE durante 2 anos.	75
Tabela 3	Peptídeos Identificados de β -caseína a partir do extrato aquoso de queijo Coalho da região de Jaguaribe-CE.	105
Tabela 3	Peptídeos Identificados de β -caseína a partir do extrato aquoso de queijo Coalho da região de Jaguaribe-CE. Continuação.	106
Tabela 4	Peptídeos Identificados de α -caseína e κ -caseína a partir do extrato aquoso de queijo Coalho da região de Jaguaribe-CE.	109

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Localização geográfica da produção de leite do Estado do Ceará.	60
Figura 2	Área delimitada da região do Jaguaribe com a localização das queijarias estudadas. Q1 a Q10, queijarias selecionadas, que participaram do processo de Identificação geográfica.	61
Figura 3	Fluxograma de produção de queijos Coalho artesanal da região de Jaguaribe-CE.	65
Figura 4	Etapas do processamento do queijo Coalho produzido na região de Jaguaribe-CE	66
Figura 4	Etapas do processamento do queijo Coalho produzido na região de Jaguaribe-CE	67
Figura 5	Queijos Coalhos produzidos na região de Jaguaribe- CE com aproximadamente 3 dias de produção e diferentes formatos e cor. (A) Queijos formato “arredondado” cor branca, (B) Queijo Formato redondo amarelo claro e excesso de manchas brancas, (C) Queijo formato redondo amarelo claro com poucas manchas brancas, (D) Queijo formato quadrado cor banca, (E) Queijo quadrado amarelo claro, (F) Queijo retangular amarelo claro.	69
Figura 6	Treinamento sensorial para padronização do queijo Coalho produzido na região de Jaguaribe-CE. (A) Avaliação do odor, (B) Avaliação do formato, (C) e da cor (D) Avaliação da forma e cores diferentes, (E) Preenchimento da ficha de avaliação, (F) Queijo com as características desejadas para o queijo Coalho de Jaguaribe-CE.	70
Figura 7	Caracterização eletroforética (PAGE-SDS) de queijos Coalho produzidos na região de Jaguaribe-CE. Depósito de 40 μL de proteínas (2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Revelação com azul de Coomassie (A) e prata (B). PM: Peso molecular padrão. CN: caseinato de sódio bovino; LS: Lactosoro; α_s -CN: α_{s1} - + α_{s2} -caseínas; β -CN: β -caseína; κ -CN: κ -caseína; para- κ -CN: para- κ -caseína; β -LG: β -lactoglobulina; α -LG: α -Lactoalbumina; Q1 a Q8: Amostras 1 a 8 dos queijos.	80
Figura 8	Caracterização eletroforética (PAGE-SDS) de queijos Coalho produzidos na região de Jaguaribe-CE. Depósito de 40 μL de proteínas (2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Revelação com azul de Coomassie (A) e prata (B). PM: Peso molecular padrão. CN: caseinato de sódio bovino; LS: Lactosoro; α_s -CN: α_{s1} - + α_{s2} -caseínas; β -CN: β -caseína; κ -CN: κ -caseína; para- κ -CN: para- κ -caseína; β -LG: β -lactoglobulina; α -LG: α -Lactalbumina; Q9 a Q16: Amostras 9 a	81

16 dos queijos. * diminuição da α_s -CN.

- Figura 9 Caracterização eletroforética (PAGE-SDS) de queijos Coalho produzidos na região de Jaguaribe-CE. Depósito de 40 μ L de proteínas (2 mg.mL⁻¹). Revelação com azul de Coomassie (A) e prata (B). PM: Peso molecular padrão. CN: caseinato de sódio bovino; LS: Lactosoro; α_s -CN: α_{s1} - + α_{s2} -caseínas; β -CN: β -caseína; κ -CN: κ -caseína; para- κ -CN: para- κ -caseína; β -LG: β -lactoglobulina; α -LG: α -Lactalbumina; Q1 a Q8: Amostras 1 a 8 dos queijos. 84
- Figura 10 Caracterização eletroforética (PAGE-SDS) de queijos Coalho produzidos na região de Jaguaribe-CE. Depósito de 40 μ L de proteínas (2 mg.mL⁻¹). Revelação com azul de Coomassie (A) e prata (B). PM: Peso molecular padrão. CN: caseinato de sódio bovino; LS: Lactosoro; α_s -CN: α_{s1} - + α_{s2} -caseínas; β -CN: β -caseína; κ -CN: κ -caseína; para- κ -CN: para- κ -caseína; β -LG: β -lactoglobulina; α -LG: α -Lactalbumina; Q9 a Q16: Amostras 9 a 16 dos queijos. 85
- Figura 11 Caracterização eletroforética (PAGE-Uréia) de queijos Coalho produzidos na região de Jaguaribe-CE. Depósito de 40 μ L de proteínas (2 mg.mL⁻¹). Revelação com azul de Coomassie (A). CN: caseinato de sódio bovino; LS: Lactosoro; α_s -CN: α_s -caseína; β -CN: β -caseína; γ -caseína: gama-caseína; Q1 a Q16: Amostras 1 a 16 dos queijos. * migração distinta após hidrólise da α_s -CN. 86
- Figura 12 Caracterização eletroforética (PAGE-SDS) de queijos Coalho produzidos na região de Jaguaribe-CE. Depósito de 40 μ L de proteínas (2 mg.mL⁻¹). Revelação com azul de Coomassie (A) e Prata (B). PM: Peso molecular padrão. CN: caseinato de sódio bovino; α_s -CN: α_{s1} - + α_{s2} -caseínas; β -CN: β -caseína; κ -CN: κ -caseína; para- κ -CN: para- κ -caseína; Q1 a Q10: Amostras 1 a 10 dos queijos. 88
- Figura 13 Caracterização eletroforética (PAGE-Uréia) de queijos Coalho produzidos na região de Jaguaribe-CE. Depósito de 40 μ L de proteínas (2 mg.mL⁻¹). Revelação com azul de Coomassie. CN: caseinato de sódio bovino; α_s -CN: α_{s1} -caseína; β -CN: β -caseína; γ -caseína: gama-caseína; Q1 a Q10: Amostras 1 a 10 dos queijos. 89
- Figura 14 Caracterização eletroforética (PAGE-SDS) de queijos Coalho produzidos no Ceará-CE, Pernambuco-PE e Rio Grande do Norte-RN. Depósito de 40 μ L de proteínas (2 mg.mL⁻¹). Revelação com prata. PM: Peso molecular padrão. CN: caseinato de sódio bovino; LS: Lactosoro; α_s -CN: α_{s1} - + α_{s2} -caseínas; β -CN: β -caseína; κ -CN: κ -caseína; para- κ -CN: para- κ - 91

caseína; Q1 a Q10: Amostras 1 a 10 dos queijos.

- Figura 15 Separação das proteínas do queijo Coalho por PAGE-2D 92 combinando isoeletrofocalização (IEF) / PAGE-SDS. Uma quantidade de 40 μ L de proteínas foi depositada no gel de primeira dimensão (IEF). As proteínas foram reveladas com azul de Coomassie (A) seguida por coloração de prata (B). Q: Amostra de queijo, α -CN: Alfa caseína, β -CN: Beta caseína.
- Figura 16 Separação das proteínas do queijo Coalho por PAGE-2D 93 combinando PAGE-uréia / PAGE-SDS. Uma quantidade de 80 μ L de proteínas foi depositada no gel de primeira dimensão (PAGE-uréia). As proteínas foram reveladas com azul de Coomassie (A) seguida por coloração de prata (B). Q: Amostra de queijo, α -CN, Alfa caseína, β -CN, Beta caseína.
- Figura 17 Cromatogramas (RP-HPLC) de peptídeos de queijo Coalho 97 produzidos na região de Jaguaribe/CE. Volumes de 100 μ L contendo 4mg de peptídeos foram injetados em coluna C18 com gradiente linear 5 a 50% (v/v) de acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético durante 60 min com fluxo de 1 mL/min. * frações com tempo de retenção de 16.989 e 39.907 minutos. Q1 a Q10: Amostras 1 a 10 dos queijos.
- Figura 18 Caracterização cromatográfica (RP-HPLC) do queijo Coalho do 99 Ceará, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Volumes de 100 μ L contendo 4mg de peptídeos foram injetados em coluna C18 com gradiente linear 5 a 50% (v/v) de acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético durante 60 min com fluxo de 1 mL/min
- Figura 19 Cromatograma (RP-HPLC) de peptídeos de queijo Coalho 101 provenientes da região de Jaguaribe-CE. Volumes de 100 μ L contendo 4mg de peptídeos foram injetados em coluna C18 com gradiente linear 5 a 50% (v/v) de acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético durante 60 min com fluxo de 1 mL/min. 1 a 28: Numeração referente aos picos sequenciados nas Tabelas 3 e 4.

LISTA DE QUADROS

Quadro1	Termos selecionados inicialmente em consenso por produtores e mestres queijeiros.	72
Quadro 2	Padrões sensoriais do queijo Coalho da região de Jaguaribe-CE escolhidos pela equipe.	73

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A	Ficha Aplicada nas Queijarias para Diagnóstico da Produção	142
Apêndice B	Ficha de Avaliação Sensorial	145

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2DE	Eletroforese bidimensional
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
DOP	Denominação de Origem Protegida
DTT	Ditiotreitol (tio-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (ethylenediaminetetraacetic acid)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance/Pressure Liquid Chromatography</i>)
IEF	Focalização isoeletrica (isoelectric focusing)
IG	Indicação Geográfica
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IPG	Gradiente imobilizado de pH (immobilized pH gradient)
kDa	Kilo Dalton
MALDI	Espectrometria de massa por desorção e ionização a laser assistida (matrix-assisted laser desorption/ionization)
MPEs	Micro e Pequenas Empresas
MS	Espectrometria de massas
m/z	Razão massa carga
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (polyacrylamide gel electrophoresis)
pI	Ponto isoeletrico
p/v	Peso por volume
SDS	Dodecil sulfato de sódio (sodium dodecyl sulfate)
SIF	Serviço de Inspeção Federal
TCA	Ácido tricloroacético
TOF	Tempo de voo (time-of-flight)
TRIS	Hidroximetil-aminometano (hydroxymethylaminomethane)
α -CN	Alfa caseína
β -CN	Beta caseína
K-CN	Kapa caseína
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	OBJETIVOS.....	
2.1	Geral.....	27
2.2	Específicos.....	27
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	
3.1	QUEIJO.....	29
3.2	QUEIJO COALHO.....	31
3.3	INDICAÇÕES GEOGRÁFICAS – IG.....	35
3.4	CARACTERIZAÇÕES ANALÍTICAS.....	40
3.4.1	Eletroforese na análise das proteínas do leite e derivados.....	40
3.4.2	Cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC.....	42
3.4.3	Espectrometria de massa na análise de leite e derivados.....	44
3.4.4	Peptídeos com atividade biológica.....	46
4	METODOLOGIA.....	
4.1	ESCOLHA DAS QUEIJARIAS – DEMARCAÇÃO E LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA.....	49
4.2	COLETA DAS AMOSTRAS DE QUEIJO COALHO.....	49
4.3	TREINAMENTO SENSORIAL DOS PRODUTORES DE QUEIJO COALHO DE JAGUARIBE PARA PADRONIZAÇÃO DO QUEIJO COM POTENCIAL PARA RECEBER O SELO DE INDICAÇÃO GEOGRÁFICA.....	50
4.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO QUEIJO COALHO DE JAGUARIBE-CE.....	50
4.5	CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA DO QUEIJO COALHO DE JAGUARIBE-CE.....	51
4.5.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	51
4.5.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de uréia (UREIA-PAGE).....	52
4.5.3	Eletroforese bidimensional acoplado IEF e SDS-PAGE.....	52
4.5.4	Eletroforese bidimensional acoplado UREIA-PAGE e SDS-PAGE.....	53
4.6	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA-RP-HPLC (COLUNA C18).....	53
4.6.1	Extração dos peptídeos solúveis em água.....	54
4.6.2	Purificação dos peptídeos solúveis em água por HPLC em coluna C18.....	54

4.7	ESPECTROMETRIA DE MASSA POR MALDI TOF.....	55
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	
5.1	CAPITULO 1 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA, IDENTIFICAÇÃO DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO, AVALIAÇÃO SENSORIAL E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	58
5.1.1	Localização geográfica das queijarias da região de Jaguaribe-CE.....	58
5.1.2	Identificação do processo de fabricação do queijo Coalho de Jaguaribe-CE e caracterização sensorial.....	62
5.1.3	Caracterização físico-química do queijo Coalho de Jaguaribe-CE	74
5.2	CAPITULO 2 - IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA DAS PROTEÍNAS DO QUEIJO COALHO DE JAGUARIBE-CE.....	79
5.3	CAPITULO 3 - IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS PROVENIENTES DO QUEIJO COALHO DE JAGUARIBE-CE UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA E ESPECTOMETRIA DE MASSA.....	95
5.3.1	Caracterização dos perfis cromatográficos dos peptídeos de queijo Coalho de Jaguaribe-CE.....	96
5.3.2	Separação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) dos peptídeos solúveis em água provenientes do queijo Coalho de Jaguaribe-CE.....	100
5.3.3	Identificação dos peptídeos purificados por HPLC utilizando espectrometria de massa.....	102
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113
7	CONCLUSÕES.....	116
	REFERÊNCIAS.....	118
	APÊNDICES.....	141

1- INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

No Nordeste brasileiro, a pecuária leiteira cresceu após apresentar-se como uma das alternativas com capacidade de gerar emprego e renda. Segundo dados do IBGE, no ano de 2009, a produção de leite no Nordeste foi de aproximadamente 4,0 bilhões de litros o que representa 13 % da produção nacional e classifica a região como a quarta em volume de leite produzido. O Ceará é o terceiro maior produtor de leite, apresentando uma produção de 432 milhões de litros/ano e os municípios de maiores produção são Morada Nova (20,8 milhões de litros/ano), Quixeramobim (15,7 milhões), Santa Quitéria (13,9 milhões), Jaguaribe (13,6 milhões) e Jaguaratama (10,6 milhões) (ANUÁRIO, 2011). Observa-se na região uma elevada taxa de crescimento no número de agroindústrias que utilizam o leite como matéria-prima para fabricação de queijos, e o queijo Coalho, um dos mais tradicionais queijos produzidos no Nordeste Brasileiro, é amplamente fabricado e consumido nesta região. A produção destes queijos, anteriormente, era restrita à região nordestina, sendo encontrados, principalmente, nos Estados do Ceará, especialmente, na região de Jaguaribe e Tauá, no Rio Grande do Norte, na região do Seridó, no Estado de Pernambuco, destaca-se a região de Garanhuns, em Alagoas a de Batalha, no Piauí a de Parnaíba e em Sergipe - Nossa Senhora da Glória. Entretanto, com a popularização do produto que atrai consumidores regionais e/ou turistas que vêm ao Nordeste, a produção deste queijo estendeu-se às regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul.

Contudo, a qualidade e descaracterização destes produtos e a concorrência desleal devido à comercialização de queijos chamados de Coalho, mas com características totalmente distintas do original configuram-se como os principais entraves na comercialização dos produtos originais. Ações de pesquisa e desenvolvimento relacionadas à segurança, qualidade e ainda valorização à territorialidade dos queijos podem ganhar novos mercados por meio da agregação de valor. O interesse pelos queijos artesanais é crescente a exemplo dos países da União Européia (UE), onde alguns tipos de queijos artesanais podem ser preferíveis aos industriais. Esta tendência também tem sido observada aqui no Brasil, que está procurando tipificar seu queijo por meio das indicações geográficas (IG). O surgimento no mercado brasileiro de um produto totalmente tipificado poderá ter

importância econômica, tecnológica e social inigualável, pelo fato de se poder obter no futuro queijos adaptados ao clima, paladar e culinária da região Nordeste do Brasil, sem contar com o potencial do mercado deste produto para outros Estados brasileiros, ocasionado pela segurança do produto tipificado, onde queijos com garantia de qualidades sensorial e microbiológica poderão ser ofertados aos apreciadores.

Em decorrência da popularidade, aceitabilidade e tradição do queijo Coalho na alimentação do nordestino, difundidos pelas suas características inigualáveis na preparação de iguarias como queijo Coalho na brasa, queijo Coalho com tapioca, frito na manteiga da terra com cuscuz, queijo Coalho com mel de engenho, com pamonha, etc. este produto tem se tornado um símbolo da gastronomia regional apreciado pela população local, nacional ou internacional que visitam a região Nordeste. Muitos estudos têm sido realizados na área de processamento, tecnologias de fabricação, condições higiênico-sanitárias, boas práticas de fabricação para estes queijos denominados artesanais a exemplo de estudos do perfil microbiológico, perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *staphylococcus* sp. isoladas de queijos e processo de identificação e qualificação do queijo Coalho no Nordeste do Brasil também tem sido investigados (MUCHNIK *et al.*, 2005; NASSU, *et al.*, 2001; RAPINI, *et al.*, 2004) visando maior caracterização deste tradicional queijo. Entretanto, estudos bioquímicos, e proteômicos dos queijos artesanais que possam apontar algumas respostas inclusive as questões de diferenciação do produto com base no saber fazer e/ou tradição, tem despertado interesse em pesquisadores no sentido de encontrar indicadores que sirvam de marcadores para que possam vir a contribuir com os processos de indicações geográficas, principalmente de denominação de origem.

Em países europeus os queijos artesanais, principalmente com IG têm sido bastante estudados, visando uma caracterização precisa para buscar um certificado de originalidade dos produtos, a exemplo dos queijos italianos Canestrato Pugliese, Fiore Sardo e Pecorino Romano, onde foram estudadas as características microbiológicas, bioquímicas, sensoriais, reológicas e componentes voláteis (DI CAGNO, *et al.*, 2003; PIRISI, *et al.*, 2000). Somados aos estudos bioquímicos e físico-químicos destes queijos artesanais, inúmeros autores têm buscado marcadores de autenticidades destes produtos. Como exemplo, do queijo Serpa de

origem portuguesa e com uma proteção por Denominação de Origem Protegida (DOP), que pode ser analisado quanto a sua autenticidade relacionada a queijos elaborados com coagulantes vegetais (*Cynara cardunculus*) através de eletroforese capilar (ROSEIRO, *et al.*, 2003). Também Karoui *et al.* (2005) mostraram a possibilidade de monitorar a origem geográfica do queijo Gruyère por espectroscopia e já identificaram que a proteólises da alfa-s-caseína é um marcador para identificar a qualidade e a maturação do queijo Grana Padano, de origem italiana e protegido por uma DOP.

A fim de alcançar o conhecimento adequado para atender às normas de segurança alimentar e para questões de indicação geográfica é de fundamental importância obter informações analíticas detalhadas para os queijos artesanais, como composição físico-química e caracterização bioquímica (GALLE, *et al.*, 2011; COSTA SOBRINHO, *et al.*, 2012). Entretanto, a legislação específica para queijos artesanais no Brasil está em discussão no Ministério da Agricultura, pois a mesma não se enquadra para os queijos artesanais brasileiros.

O mapeamento preciso e demarcação da região geográfica, seguida da identificação do processo artesanal e caracterização do produto através das análises físicoquímicas, bioquímicas e proteômicas são os primeiros passos para validar e certificar o queijo Coalho produzido na região de Jaguaribe Ceará visando a obtenção do registro de indicação geográfica.

2- OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o queijo Coalho com indicadores geográficos, bioquímicos, proteômicos, físico-químicos e sensoriais para obtenção de informações que fornecerão suporte a um futuro processo de indicação geográfica.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Demarcar precisamente através de mapeamento a região e queijarias que produzem o tradicional queijo de Jaguaribe.

Identificar o processo artesanal utilizado pelos mestres queijeiros da região demarcada com intuito de proteger o “saber fazer” tradicional que caracteriza este queijo.

Elaboração das características sensoriais dos queijos da região, como forma de estabelecer o padrão para tipificação.

Determinar as características físico-químicas dos queijos Coalho produzidos na região demarcada em Jaguaribe-CE.

Identificar e caracterizar as proteínas dos queijos Coalho produzidos em Jaguaribe-CE através de estudos eletroforéticos.

Identificar peptídeos gerados a partir da fabricação do queijo Coalho que possam conferir ao produto características como atividade biológica.

Fornecer resultados das técnicas bioquímicas e proteômicas que possam selecionar e contribuir na identificação de marcadores para futura certificação da originalidade do produto (queijos) fabricado na região de Jaguaribe.

3- REVISÃO DE LITERATURA

3.1 QUEIJO

O queijo é um concentrado lácteo constituído de proteínas, lipídios, carboidratos, sais minerais, cálcio, fósforo e vitaminas, entre elas A e B. É um dos alimentos mais nutritivos que se conhece: contém cerca de 23-25% de proteína o que significa que, em termos de valor proteico, 210 g desse produto equivalem a 300 g de carne (PERRY, 2004).

Segundo a Portaria N^o 146, de 07/03/1996 do MAPA (BRASIL, 1996) queijo é definido como o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas e bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.

Os primeiros queijos surgiram provavelmente a partir do momento que o homem iniciou a domesticação de animais. De geração em geração, receitas foram criadas, surgiram formas, inventaram-se ferramentas para erigir um patrimônio excepcional (SPERAT-CZAR, 2012). Existem diversas hipóteses a respeito de sua descoberta, a maioria relacionada ao uso de recipientes ou sacos feitos com o couro do estômago de animais, onde o leite era guardado e transportado. O contato do leite com as enzimas contidas no couro promovia sua coagulação, gerando uma massa branca, de sabor agradável. Com o passar dos tempos, a massa foi colocada em fôrmas, adicionados sabores e maturada, chamando o produto resultante de queijo (ANDRADE, 2006). Acredita-se que antes do nascimento de Cristo, já se conhecia a arte de sua fabricação, cabendo aos egípcios a primazia da utilização do leite e do queijo, como fonte importante de nutrientes, principalmente, proteínas e minerais, como cálcio, fósforo e zinco, além de apresentar um elevado valor calórico (ALBUQUERQUE; CASTRO, 1996; AQUINO, 1983). De acordo com Perry (2004), o processo básico de fabrico de queijos é comum aos mais diferentes tipos, dependendo de variações como: origem do leite, técnicas de processamento e tempo de maturação. A qualidade e as propriedades sensoriais de um queijo estão condicionadas aos seguintes fatores: o tipo de leite utilizado (cabra, ovelha, vaca,

etc.), alimentação e raça dos animais, tipo de substância utilizada para coagular o leite, e condições particulares do processo de maturação, como umidade e temperatura (EGITO, *et al.*, 2008). Existem em todo o mundo mais de 1.000 tipos de queijos, feitos a partir de diferentes leites e processos de produção, conferindo assim diferentes formas, texturas, sabores, odores, cores, agradando a todos os paladares (Láctea Brasil, 2006).

O mercado de queijos apresenta uma forte característica que é a existência de um grande número de pequenos e micro laticínios que atuam regionalmente e fora do âmbito do Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura – SIF. O predomínio desses pequenos produtores dificulta a obtenção de informações oficiais sobre a produção total de queijos no Brasil, uma vez que não há um registro oficial do que é produzido por essas micro e pequenas empresas informais. No Brasil os queijos artesanais mais famosos são fabricados nessas pequenas empresas como: Queijo Minas (na região de Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado e Serro); Queijo Colonial e Serrano (RS); Queijo Colonial (SC); Queijo Coalho e Manteiga (região Nordeste); Queijo do Marajó (PA). O queijo de minas, como alimento ou manifestação cultural, faz parte da identidade mineira e, em maio de 2008, obteve o registro do seu modo de produção artesanal como patrimônio imaterial brasileiro, concedido pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN).

O queijo Coalho artesanal produzido com leite cru é um dos produtos mais tradicionais do nordeste brasileiro, cujo modo de produção nas propriedades rurais vem passando por várias gerações, de pai para filho, desde que o queijo foi introduzido no Brasil, como herança da colonização portuguesa. Além da sua importância cultural, o queijo Coalho artesanal é fonte de renda para inúmeras famílias que se dedicam à sua produção em diferentes Estados do Nordeste.

Os franceses utilizam a palavra “terroir” para distinguir produtos de determinada e exclusiva região geográfica e usam esse termo em grande parte de seus queijos artesanais. Dias (2010) destaca cinco queijos brasileiros como terroirs: Serrano, Coalho, Serra da canastra, Serro e Serra do salitre. Produtos “terroirs” são particularmente atraentes para os consumidores hoje em dia.

3.2 QUEIJO COALHO

Entende-se por queijo Coalho, o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação (BRASIL, 2001).

A origem do seu nome deriva do fato de ter sido tradicionalmente manufaturado com leite coagulado pela ação de coalho animal, extraído do estômago de pequenos animais tais como cabrito, bezerro, preá, mocó (AQUINO, 1983). Hoje esta prática foi substituída pelo uso de coalho industrial.

Ele é classificado como queijo de média a alta umidade, de massa semi-cozida ou cozida e apresentando um teor de gordura nos sólidos totais variando entre 35,0% e 60,0%, podendo, portanto ser classificado como um queijo gordo ou semi-gordo (BRASIL, 1996). É produzido em vários estados da região Nordeste do Brasil a partir de leite de vaca cru (FEITOSA, *et al.*, 2003) e/ou leite pasteurizado (CAVALCANTE, *et al.*, 2007). Sendo também possível sua fabricação com leite de cabra (EGITO; LAGUNA, 1999).

Queijo Coalho é um dos mais conhecidos queijos tradicionais brasileiros. Foi introduzido pelos europeus na região Nordeste, há mais de 150 anos (QUEIROGA, *et al.*, 2013). A produção desta iguaria surgiu como uma forma de viabilizar a comercializar o leite produzido nas fazendas (ANUÁRIO, 2011) e sua produção artesanal é de valor inestimável para os aspectos sócio-econômicos da região (PERRY, 2004). Além disso, envolve uma parcela considerável de pequenos e médios produtores estabelecidos especialmente na zona rural, para as quais esta atividade econômica significa a principal fonte de renda e trabalho (PIRES, *et al.*, 1994).

No Ceará o queijo Coalho é o produto derivado do leite mais fabricado. Este derivado lácteo é produzido por 69,4% dos estabelecimentos. A estimativa é de que existam 500 unidades produtivas de queijo Coalho no Estado (ANUÁRIO, 2011).

No Nordeste, está entre os principais tipos de queijos artesanais comprovadamente incorporados à cultura regional. A maior parte da fabricação é

artesanal e o queijo é feito com leite cru (SEBRAE/ESPM, 2008). O queijo Coalho foi inicialmente conhecido nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, mas rapidamente alcançou os mercados dos estados do centro do País até chegar ao Sudeste. Hoje, domina parte do mercado de queijos no Rio de Janeiro e São Paulo, onde é comercializado nos principais supermercados e distribuidores (LATICINIO, 2013). A produção de queijo Coalho no Nordeste brasileiro concentra-se geralmente no período de março a junho, quando ocorre a maior precipitação de chuva na região, com crescimento do pasto natural e conseqüente aumento na produção de leite bovino. Neste período, a produção de queijo Coalho na região atinge seu ponto máximo. Nos outros meses a produção de queijo diminui consideravelmente, em razão da escassez de matéria-prima. Algumas pequenas queijarias chegam a paralisar suas atividades (SEBRAE, 1998).

A consolidação do queijo Coalho como um derivado do leite apreciado pelos consumidores do Nordeste e de outras regiões, demonstra seu potencial econômico. É um produto com dinâmica de mercado crescente. Com um alto índice de aceitação, o queijo Coalho chegou as prateleiras dos supermercados, às mesas do café da manhã, nas lanchonetes, nas praias e à cozinha de *chefs* renomados (ANUÁRIO, 2011). Constitui-se em importante ingrediente no preparo de pratos típicos da região Nordeste, como baião-de-dois, tapioca e canjica. Nas praias da região Sudeste, é cada vez mais comum encontrar vendedores ambulantes que assam o queijo Coalho na brasa e o oferecem aos banhistas (SEBRAE/ESPM, 2008).

No Ceará, um dos lugares de maior tradição na produção de queijo Coalho é o município de Jaguaribe, apesar dos municípios de Jaguaratama, Jaguaribara, Milhã, Senador Pompeu, Quixeramobim e Tauá também o produzirem. O queijo Coalho do Jaguaribe é o resultado de um processo artesanal de produção, a partir do leite cru integral de vaca, produzido numa região onde um conjunto de fatores de solo, relevo, clima e vegetação, modo de fazer contribuem diretamente para o sabor especial ao queijo.

A denominação dos queijos muitas vezes é ligada ao nome do município de sua origem ou ao seu local de maior produção, daí temos o Queijo Coalho de Jaguaribe, o queijo Coalho de maior fama e tradição do Ceará. Manter a tradição e

produzir um queijo Coalho conforme as suas origens é um grande desafio para os produtores da região jaguaribana.

Apesar de o queijo Coalho ser fabricado em todo Nordeste, cada estado possui sua tecnologia de fabricação específica. No Estado de Pernambuco, por exemplo, o queijo Coalho é de massa crua (sem aquecimento), Rio Grande do Norte faz dois cozimentos um na massa outro no queijo. Além do cozimento da massa no tanque de coagulação fazem um cozimento do queijo em soro quente após a 1ª prensagem. Algumas queijarias do Ceará usam as mesmas técnicas, mas a grande maioria aquece apenas a massa. Essa diferença é observada nos resultados analíticos. O queijo Coalho do Ceará foi classificado em extra gordo ou duplo creme, gordo e de média umidade com teor médio de proteína em 25,02%, acidez 0,26% e pH 5,2 (FEITOSA, 1984; SEBRAE, 1998; NASSU, *et al.*, 2001). Em Pernambuco, foi classificado em semi gordo e alta umidade (SENA, *et al.*, 2000), em Sergipe, como alta umidade a muita alta umidade, com índice de acidez variando de 0,3% a 1,71% (SENA, *et al.*, 2000) e na Paraíba, em gordo, de média umidade a alta umidade, com teor de proteína variável de 21,78% a 23,47% (AQUINO, 1983). As variáveis do processo e a composição do leite são as principais fontes de variação com importância tecnológica que exercem influência na qualidade e nas características do produto final (ANDRADE, 2006).

Em diagnóstico das condições de processamento do queijo Coalho do Rio Grande do Norte, Nassu *et al.* (2003) identificaram que em 80% dos casos o leite não é pasteurizado. A prensagem é feita em prensas de madeira e em formato retangular. O queijo depois de pronto, geralmente, é armazenado em refrigerador e vendido sem embalagem, embora tenha sido encontrada embalagem a vácuo nas unidades de maior porte.

O queijo Coalho artesanal de Jaguaribe é tradicionalmente obtido a partir de leite cru, sem tratamento térmico. A legislação brasileira, porém, exige que produtos derivados de leite cru sejam comercializados somente após quarentena de 60 dias de maturação. Essa legislação gera conflito entre os produtores de queijos frescos feitos com leite cru e os órgãos fiscalizadores. É o caso, por exemplo, do queijo Coalho artesanal do nordeste e o queijo minas artesanal em Minas Gerais. Essa situação já foi enfrentada por produtores de outros países, entre os quais a

França que possui um grande número de queijos produzidos com leite cru e o impasse foi resolvido com a implantação de boas práticas de manejo do gado e higiene rigorosa em todas as etapas de produção do queijo garantindo, assim, a qualidade microbiológica do produto e preservando a saúde do consumidor. No Brasil as queijarias também estão seguindo os mesmos passos com ajuda de instituições de pesquisa, de organizações não governamentais. No entanto, a produção do queijo Coalho artesanal esbarra na legislação brasileira, que ainda não entrou em consenso com uma legislação específica para esse produto artesanal. Considerando a necessidade de estabelecer critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais o Ministério da Agricultura publicou em dezembro de 2011 a Instrução Normativa (IN) nº 57, entretanto, essa não é uma legislação específica para o produto queijo artesanal do Brasil de hoje, e atendendo a apelos dos produtores foi criado de um Grupo de Trabalho , com a função de revisar a IN MAPA nº 57 e estabelecer um marco regulatório para a produção e comercialização de produtos artesanais que até hoje são considerados queijos clandestinos.

Como a legislação para este queijo é muito abrangente e pouco definida, contempla as variações percebidas na composição físico-química do produto, refletindo na falta de identidade do queijo Coalho. As diferenças na sua composição físico-química podem ser verificadas em várias regiões do nordeste, como no Ceará (NASSU, *et al.*, 2001), em Pernambuco, em Sergipe (SENA, *et al.*, 2000) e na Paraíba (AQUINO, 1983).

3.3 INDICAÇÕES GEOGRÁFICAS - IG

As Indicações Geográficas são ferramentas coletivas de proteção e promoção comercial de produtos tradicionais vinculados a determinados territórios. Elas possuem duas funções principais: agregar valor ao produto e proteger a região produtora. Os sistemas de Indicações Geográficas, além de proteger, devem promover os produtos e sua herança histórico-cultural, que é intransferível (GIESBRECHT, 2011).

No Brasil o INPI é responsável pela análise e concessão dos certificados de indicação de origem. O processo de certificação envolve a capacidade de um

grupo de produtores, industriais, entre outros, de provar que determinado produto pertence a uma região, dona de topografia, clima, história e processo de produção imemorial (MENEGETI, 2010).

As Indicações Geográficas são divididas em duas espécies:

INDICAÇÃO DE PROCEDÊNCIA (IP): Esta espécie valoriza a tradição produtiva e o reconhecimento público de que o produto de uma determinada região possui uma qualidade diferenciada. É caracterizada por ser área conhecida pela produção, extração ou fabricação de determinado produto. Ela protege a relação entre o produto e sua reputação, em razão de sua origem geográfica específica.

DENOMINAÇÃO DE ORIGEM (DO): É a espécie onde as características daquele território agregam um diferencial ao produto. Define que uma determinada área tenha um produto cujas qualidades sofram influência exclusiva ou essencial por causa das características daquele lugar, incluídos fatores naturais e humanos. Em suma, as peculiaridades daquela região devem afetar o resultado final do produto, de forma identificável e mensurável (GIESBRECHT, 2011).

A certificação da qualidade em alimentos já se configura como uma ferramenta de mercado essencial, incorporada ao segmento alimentar, principalmente em países desenvolvidos, onde tem apresentado demanda crescente (FARINA; ZYLBERSZTAJN, 1994). Até recentemente, a aquisição de um produto pelo consumidor era baseado, principalmente, na presença dos atributos de qualidade extrínsecos, tais como preço, aparência, cor, tamanho, formato (FENNEMA, 1997). No entanto, os consumidores têm dado ênfase a hábitos alimentares mais saudáveis, buscando a aquisição de alimentos baseada nos novos conceitos de segurança fortemente suportados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização Mundial do Comércio (OMC). Por outro lado, os atributos de qualidade intrínsecos, tais como valor nutritivo, ausência de aditivos e resíduos químicos, danos no meio ambiente, confiança no produto, atributos esses que podem ser percebidos pelo consumidor por meio de selos ou certificados que os comprovem (SPERS, *et al.*, 1999).

Os certificados de qualidade, definição de atributos de um produto, processo ou serviço e a garantia de que eles se enquadram nestas normas pré-

definidas (PERI; GAETA, 1999), surgem como uma alternativa para comprovar os atributos intrínsecos, tornando o consumidor mais seguro ao consumo do alimento, evitando ações indevidas por parte de empresas (FARINA; ZYLBERSZTAJN, 1994). Na Europa, a certificação de produtos agroalimentares, surgiu como uma estratégia para melhorar a qualidade de tais produtos, estando aí incluídos, os produtos artesanais.

A certificação de origem tem-se mostrado a forma mais eficaz da melhoria da qualidade dos produtos artesanais, em todo o mundo. Dessa forma, além de auxiliar o consumidor na aquisição de um produto com qualidade assegurada, os sistemas de certificação de origem promovem a fixação do homem no campo e a valorização de seu território.

Nos últimos anos, consumidores e pesquisadores têm mostrado interesse em produtos regionais e tradicionais com certificado de qualidade. Este conceito envolve os fatores naturais, humanos e estão relacionados à área geográfica. Entre os elementos que podem ocasionar algumas destas características está a alimentação/pastoreio consumido pelos animais, elementos naturais que caracterizam a região geográfica (geologia, clima, topografia, etc.), a microbiota natural presente no leite, a flora botânica e práticas da produção de queijos com leite cru que preserva a microbiota nativa após processamento. A alimentação animal é um dos fatores que tem se mostrado de grande importância na fabricação de queijos (BUCHIN, *et al.*, 1999; BUGAUD, *et al.*, 2001). Vários autores têm demonstrado que ocorre diferença no sabor do queijo em função do tipo de pasto ofertado ao rebanho (BUCHIN, *et al.*, 1999; VERDIER-METZ, *et al.*, 2000).

O queijo Coalho é mais comumente produzido artesanalmente e por algumas poucas indústrias inspecionadas. Na fabricação artesanal, este produto é fabricado com leite cru em sua grande maioria, o que lhe confere características únicas que são percebidas pelo consumidor deste tipo de queijo. A pasteurização do leite, obrigatório pela legislação para a fabricação do queijo Coalho produzido em estabelecimentos inspecionados, muda consideravelmente as suas características sensoriais.

Queijos fabricados com leite cru é muito comum em países europeus, como a Grécia, França, Espanha e Itália, muitas categorias de queijo desses países são considerados de altíssima qualidade e têm uma Denominação de Origem Protegida (DOP): exemplos típicos são Feta (Grécia), Roquefort (França), Idiazabal (Espanha) e Pecorino Romano, Pecorino sardo, Pecorino Toscano, Fiore Sardo, Canestrato Pugliese (Itália) (SFORZA, *et al.*, 2008). Em Portugal encontram-se protegidos queijos de 12 origens diferentes e modos de produção específicos. A Itália possui cerca de 34 tipos de queijos com DOP. Na França é onde temos o maior número de queijos protegidos, em torno de 43, como exemplos dos mais famosos temos, os queijos Rochefort, Comté, Cantal, Camembert.

Embora a proteção de queijos artesanais com IG esteja circunscrita principalmente aos países do sul da Europa, o surgimento no mercado brasileiro de produtos totalmente tipificados, poderá ter importâncias econômicas, tecnológicas e sociais inigualável, pelo fato de se poder obter no futuro queijos adaptados ao clima, paladar e culinária da região Nordeste do Brasil, sem contar com o potencial do mercado deste produto para outros estados brasileiros, ocasionado pela segurança alimentar do produto tipificado, onde queijos com garantia microbiológica e propriedades sensoriais aceitáveis poderão ser ofertados aos apreciadores.

Em decorrência da popularidade, aceitabilidade e tradição do queijo Coalho na alimentação do Nordeste, este produto apresenta grande potencial para obtenção de IG, ocasionada pelas suas características inigualáveis na preparação de iguarias como queijo Coalho na brasa, queijo Coalho com tapioca, frito na manteiga da terra com cuscuz, queijo Coalho com mel de engenho, com pamonha, etc., este produto tem se tornado um símbolo da gastronomia regional apreciado pela população local, nacional e internacional que visitam a região Nordeste.

Devido à importância do produto para a economia e gastronomia nordestina, vários autores têm realizado estudos visando o diagnóstico das condições de processamento no Ceará e Rio Grande do Norte (NASSU, *et al.*, 2001 e 2003), busca de microorganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos Coalhos produzidos e comercializados em Pernambuco (DUARTE, *et al.*, 2005), perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus sp.* isoladas de queijos (RAPINI, *et al.*, 2004) e processo de identificação e qualificação do queijo

Coalho no Nordeste do Brasil (MUCHNIK, *et al.*, 2005). Observa-se, porém que nenhum estudo bioquímico, proteômico e de caracterização geográfica do queijo Coalho foi realizado. No entanto, em países europeus queijos artesanais principalmente com IG têm sido bastante estudados, visando uma caracterização precisa para buscar um certificado de originalidade dos produtos, a exemplo dos queijos italianos Canestrato Pugliese, Fiore Sardo e Pecorino Romano, onde foram estudadas as características microbiológicas, bioquímicas, sensoriais, reológicas e componentes voláteis (DI CAGNO, *et al.*, 2003; LARRÁYOS, *et al.*, 2001; MANNU, *et al.*, 2000, PIRISI, *et al.*, 2000). Também foram observados em outros queijos tradicionais peptídeos bioativos como exemplo, o opioide β -casomorfina isolado do queijo Brie (JARMOLOWSKA, *et al.*, 1999), inibidor da enzima de conversão de angiotensina identificados em queijos Manchego (GOMEZ-RUIZ, *et al.*, 2002) e Gouda (SAITO *et al.*, 2000)

As características específicas de cada queijo artesanal dependem da tecnologia empregada na sua produção, o tipo de leite utilizado, a microbiota que gera compostos bioquímicos específicos, tais como moléculas voláteis e peptídeos por meio de processos enzimáticos (GAGNAIRE, *et al.*, 2001, 2011; GALLE, *et al.*, 2011). Estes aspectos bióticos são combinados com fatores ambientais conhecidos como o efeito de "terroir", tais como o tipo de alimento oferecido ao gado, temperatura e umidade relativa do ar (IRLINGER; MOUNIER, 2009).

As Indicações Geográficas (IG), são importantes ferramentas de desenvolvimento rural, utilizadas para identificar produtos ou serviços por meio de sua origem, qualidade, fabricante ou outra característica própria, além de representarem um fator de competitividade no setor produtivo. No Brasil existe 12 Indicações de Procedência além de duas Denominações de Origem. As 12 Indicações de Procedência são: Vale dos Vinhedos (Vinhos e Espumantes), Cerrado Mineiro (Café), Pampa Gaúcho da Campanha Meridional (Carne Bovina e seus derivados), Vale dos Sinos (Couro Acabado), Paraty (Aguardentes, tipo cachaça e aguardente composta azulada), Vale do Submédio São Francisco (Uvas de Mesa e Manga), Pinto Bandeira (Vinhos tintos, brancos e espumantes), Região da Serra da Mantiqueira de Minas Gerais (Café), Goiabeiras (Panela de Ferro), Jalapão (Artesanato em Capim Dourado), Pelotas (Doces Tradicionais de Confeitaria e de

Frutas) e Região do Serro (Queijo). As duas Denominações de Origem são Litoral Norte Gaúcho (Arroz) e Costa Negra (Camarão) (GIESBRECHT, 2011).

Minas Gerais possui reconhecidas cinco áreas produtoras de queijo artesanal. As regiões do Serro e da Canastra já possuem o registro de IG, que deverá ser levado agora para as regiões de Araxá, Campos das Vertentes e Cerrado. Entre os benefícios gerados pelo registro de IG estão a padronização e melhoria qualitativa do produto, bem como a maior organização dos produtores em associações e cooperativas, além da agregação de valor ao produto, sua rastreabilidade e a salvaguarda do patrimônio cultural e o desenvolvimento do agroturismo (SERTÃOBRAS, 2013).

O crescente interesse e consumo de produtos lácteos regionais como os queijos de Denominação de Origem Protegida, torna indispensável o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas analíticas que permitam assegurar a sua autenticidade e controlar eventuais fraudes (VELOSO, 2002).

3.4 CARACTERIZAÇÕES ANALÍTICAS

A maioria das identificações de autenticidade de produtos lácteos baseia-se em importantes metodologias para análise das proteínas de leite (STANCIUC; RAPEANU, 2010). Diferentes abordagens analíticas têm sido aplicados para fins de identificação, entre eles, eletroforese (MAYER, 2005) e cromatografia (ENNE, *et al.*, 2005) merecem destaque. Espectrometria de massa por desorção e ionização a laser assistida em tempo de voo (MALDI-TOF-MS) é uma técnica potencialmente útil, com capacidades comprovadas na identificação de proteínas e, mais recentemente, através da utilização de padrões internos para fins de quantificação de proteínas ou peptídeos específicos (NICOLAOU, *et al.*, 2011), sendo uma técnica bastante precisa para análise de leite e derivados e consequentemente certificação de sua qualidade e origem.

3.4.1 ELETROFORESE NA ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DE LEITE E DERIVADOS

A eletroforese é uma técnica versátil para análise de proteínas. Essa técnica foi utilizada pela primeira vez por Arne Tiselius em 1937, que separou proteínas não enzimáticas do soro sanguíneo em solução (BREWER; SING, 1970) e mais tarde aperfeiçoada com a introdução de uma camada suporte, de poliacrilamida por Ornstein e Davis no ano de 1962. Consiste basicamente na migração diferencial de proteínas em campo elétrico, cuja velocidade de deslocamento das moléculas depende da carga elétrica líquida de sua superfície externa, seu tamanho e forma (COSTA; SOUSA, 1999). A revelação de bandas é feita com corantes, mostrando tamanho, intensidade de cor e distância do ponto de aplicação, os quais são usados para comparar as amostras (WEBER; OSBORN, 1975).

É uma técnica com grande poder de separação molecular, pois possibilita separar não somente com base na carga da proteína, mas explorar melhor as diferenças no tamanho das cadeias polipeptídicas (MARKET; MOLLER, 1959).

Esta técnica tem sido bastante utilizada para caracterização das proteínas e peptídeos do leite e derivados. Mayer e Hörtner (1992) utilizaram eletroforese em gel de poliacrilamida para separar a β -caseína e assim determinar a presença das caseínas bovinas em produtos lácteos. Utilizando a técnica de SDS-PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Sodium Dodecyl Sulfate) é possível quantificar as caseínas e as proteínas do soro em leite processado líquido e em pó (BASCH, *et al.*, 1985) e determinar a composição das proteínas do soro em leite de cabra e de ovelha (CASPER, *et al.*, 1998). Eletroforese tem sido bastante utilizada para diferenciar misturas de leite de diferentes espécies no leite fluido e derivados. Buzi, *et al.*, (2009) e Faleiro (2013) observaram a presença de leite de vaca nas amostras de mussarela de búfala analisadas, utilizando eletroforese PAGE-SDS. Amigo, *et al.* (1991) utilizaram a análise eletroforética das proteínas do soro para detectarem a adulteração da adição de soro em leite, e verificaram que a razão entre a β -lactoglobulina A e B e a albumina sérica bovina forneceu resultados muito precisos para identificar este tipo de fraude. Egito, *et al.* (2006) mostraram que o método Uréia-PAGE é eficiente para identificação de adulteração do leite de cabra com leite de vaca. Apesar destas técnicas eletroforéticas serem muito úteis na análise de misturas de leite, a detecção é mais difícil em queijos com proteólise

intensa. Diversos fatores, como o pH, tipo de coagulante, quantidade de soro que permanece na coalhada e o uso de culturas “starter”, podem afetar a proteólise das caseínas. PAGE-ureia é amplamente utilizado para caracterizar a proteólise primária em queijo (PARK, 2001; PAVIA, *et al.*, 2000). Sendo esta técnica bastante utilizada para verificar a hidrólises das proteínas durante a maturação de queijos a exemplo dos estudos de Gagnaire *et al.* (2001) com queijo Emental e queijo Tounj realizado por Kalit *et al.* (2005).

Para cada proteína existe um pH específico, denominado ponto isoelétrico (pI), o qual estabiliza a migração da proteína quando submetida a um campo elétrico, por não apresentar carga. Cada proteína, pode diferenciar-se de uma outra, por uma ou mais proteínas, podendo ser potencialmente distinguida através da eletroforese (NÓBREGA, *et al.*, 2010). A focagem isoelétrica (pH 4 a 9) tem sido utilizada como primeira eletroforese, seguida por uma eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS ou ureia para separar as caseínas do leite (GRAPPIN & RIBADEAU-DUMAS, 1992). Estes autores relatam que com esta técnica (Eletroforese bidimensional – 2D), é possível separar não só as caseínas como também a para-k-caseína, a β -lactoglobulina e α -lactoalbumina.

A eletroforese bidimensional permite o acesso a dados qualitativos que mostram se uma proteína está presente ou não na amostra estudada e, dados quantitativos, que revelam as concentrações de determinada proteína nas diferentes condições analisadas (GORG, *et al.*, 1999). É utilizada para se conseguir uma melhor separação de misturas proteicas extremamente complexas (STRANGE, *et al.*, 1992), exemplo dos estudos utilizando eletroforese 2D realizados para identificação de proteínas do leite de vaca e colostro (LINDMARK-MANSSON, *et al.*, 2005), leite de ovelha (PISANU, *et al.*, 2012) ou em aplicações de técnicas proteômicas para identificação do perfil proteínas e peptídeos do queijo Teleme fabricado com leite de ovelha, cabra, vaca maturado por 120 dias (PAPA, *et al.*, 2008).

Portanto, métodos eletroforéticos e cromatográficos são freqüentemente utilizados para a caracterização individual dos peptídeos formados e conferirem uma caracterização completa da proteólise em queijos (FARKYE; FOX, 1990).

3.4.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA - HPLC

Os métodos cromatográficos apresentam uma elevada reprodutibilidade dos resultados e permitem recolher facilmente os compostos separados para análises posteriores. Quando o objetivo é caracterizar um determinado produto alimentar (ou seja, um dado presunto ou queijo), várias questões são consideradas, e, portanto, diferentes abordagens analíticas são necessárias, nos parâmetros nutricionais que requerem a determinação dos componentes, tais como lipídios, carboidratos, proteínas e vitaminas. É também cada vez mais necessário na avaliação de compostos que supostamente têm propriedades funcionais, como peptídeos anti-hipertensivos ou ácido linoléico conjugado, por exemplo. Finalmente, marcadores moleculares de qualidade dos alimentos tornaram-se de interesse recentemente. A utilização de técnicas cromatográficas, como a sua capacidade de separação, juntamente com a espectrometria de massa, e sua capacidade de identificação molecular insuperável, podem fornecer resposta significativa para a muitos problemas analíticos (DI STEFANO, *et al.*, 2012).

Nos últimos anos técnicas cromatográficas têm sido “ferramentas” bastante utilizadas para caracterização de leite e derivados. Cromatografia líquida em fase reversa (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography-RP-HPLC) e cromatografia por *fast protein liquid chromatography* (FPLC) foram usadas para separar proteínas do soro de leite de várias espécies (PELLEGRINO, *et al.*, 1991; LAEZZA, *et al.*, 1991). Law e Tziboula (1992), Law, *et al.* (1992) e Kaminarides e Anifantakis (1993) utilizaram HPLC e FPLC para separação das caseínas bovina, ovina e caprina. κ -caseína foi isolada a partir do leite de equinos por HPLC de fase reversa e a sua estrutura primária foi inteiramente determinada (IAMETTI, *et al.*, 2001). Estudos por RP-HPLC foram realizados por Martins (2006) para identificar os produtos de fermentação formados pela inoculação de Kefir e Tiber em amostras de leite e iogurte. Técnicas de cromatografia líquida (RP-HPLC), com detecção por ultravioleta e fluorescência, foram igualmente utilizadas para a identificação de leite de vaca em leite e queijo de outras espécies, através da análise da composição em β -lactoglobulina A bovina (URBANKE, *et al.*, 1992). Enquanto que Ferreira e Caçote (2003) usaram a técnica de RP-HPLC para detectar e quantificar percentagens de leite de vacas, ovelhas e cabras em queijos portugueses com denominação

protegida mostrando-se um método muito sensível e preciso para identificar queijos frescos e curados fabricados com leite cru.

A técnica de RP-HPLC tem sido também usada na separação e identificação de peptídeos em queijos, permitindo, assim, um controle de qualidade deste produto. Os peptídeos contribuem para o sabor e aroma do queijo e o seu estudo permite estimar a “idade”, o tipo de leite e de coalho utilizado na produção do queijo (STRANGE, *et al.*, 1992). Addeo, *et al.* (1992 e 1994) caracterizaram alguns peptídeos encontrados durante a maturação do queijo Parmigiano- Reggiano. Num estudo semelhante, Ferranti, *et al.* (1997) identificaram e separaram fosfopeptídeos produzidos durante a maturação do queijo Grana Padano, por RP-HPLC. RP-HPLC de frações de queijo solúveis em água são comumente utilizados para a análise de características dos perfis peptídeos deste alimento. Alguns destes peptídeos têm sido identificados em estudos exploratórios utilizando principalmente sequenciamento de aminoácidos e espectrometria de massa (MS) (ADDEO *et al.*, 1992 e ADDEO *et al.*, 1994; BOUTROU *et al.*, 2001; LUND ; ARDO, 2004; SOUSA, *et al.*, 2001).

Métodos para identificação de peptídeo em queijos iniciando com a extração de frações peptídicas, utilizando técnicas cromatográficas, e sua subsequente identificação por espectrometria de massa, permitiu extensa pesquisa dos mecanismos de proteólise envolvidos na maturação de diferentes variedades de queijo, tais como: Cheddar (ALLI, *et al.*, 1998; SINGH *et al.*, 1994), Emmental (GAGNAIRE, *et al.*, 2001), Grana Padano (FERRANTI, *et al.*, 1997; SFORZA, *et al.*, 2003), Manchego (GOMEZ-RUIZ, *et al.*, 2004 e 2006) e Parmigiano Reggiano (ADDEO, *et al.*, 1992 e 1994). Sendo, portanto a junção destas duas técnicas (Cromatografia e espectrometria de massa) imprescindível para identificar as modificações bioquímicas ocasionadas em leite e derivados durante o seu processamento.

3.4.3 ESPECTROMETRIA DE MASSA NA ANALISE DE LEITE E DERIVADOS

A espectrometria de massa, devido à sua elevada sensibilidade, exatidão e resolução na identificação das massas das proteínas, pode ser considerada a

principal ferramenta analítica no campo da Proteômica. Esta técnica mede a razão massa/carga (m/z) da amostra ionizada a ser analisada e consistem de uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector que registra o número de íons de cada valor m/z . A ionização por electrospray (ESI) e a ionização/dessorção por matriz assistida a laser (MALDI) estão entre as técnicas mais utilizadas para volatilizar e ionizar as proteínas ou peptídeos. Os principais analisadores utilizados em proteômica são *time-of-flight* (TOF), *íon trap*, quadrupolo e *fourier transform íon cyclotron* - FT-MS (AEBERSOLD; MANN, 2003). Cada um desses analisadores possui um desempenho diferente e podem ser utilizados separadamente ou em conjunto. Com os dados obtidos pela espectrometria de massas existe a possibilidade de identificação das proteínas através da comparação com os bancos de dados de sequências de genes e proteínas já disponíveis, como Genbank e SwissProt (NEBRICH, *et al.*, 2009).

A espectrometria de massa pode ser utilizada de forma eficiente para avaliar a segurança alimentar de queijos. A alta seletividade da espectrometria de massa evita resultados falso positivos (SENYUVA, *et al.*, 2008). A qualidade dos queijos pode também ser caracterizado em detalhe por meio da análise da fração de péptideo resultante dos processos naturais proteolíticos após identificado por espectrometria de massa. Os péptideos são gerados pelos acontecimentos proteolíticos durante a produção e maturação do queijo, devido à presença de enzimas proteolíticas, que são introduzidas por bactérias ácido-láticas a partir do coalho ou podem já estar presente no leite utilizado. Devido à sua complexidade, a caracterização completa da fração de péptideo em queijo pode ser conseguida apenas através de técnicas de HPLC-MS (SFORZA, *et al.*, 2003; PIRAINO, *et al.*, 2007). Os peptideos presentes em um queijo pode ser utilizado para avaliar a tecnologia da sua produção, por exemplo discriminar entre os queijos semelhantes (SFORZA, *et al.*, 2004), estabelecer a autenticidade dos ingredientes; discriminar entre o queijo produzido pelo leite de vaca, leite de ovelha, (SFORZA, *et al.*, 2008) e determinar o tempo de maturação dos queijos. Além disso, os péptideos e glicopéptidos derivados de proteínas do leite são bem conhecidos pelas suas propriedades funcionais. A espectrometria de massa é capaz de identificar a presença de tais componentes funcionais pela caracterização e quantificação de

alimentos derivados de péptidos biologicamente ativos (LEONIL, *et al.*, 2000; MASOTTI, *et al.*, 2010).

A espectrometria de massa também foi utilizada para a caracterização de leite de bubalinos e para detectar adulteração da adição do leite bovino ao leite de búfala utilizado para a fabricação de queijo Mozzarella (ANGELETTI, *et al.*, 1998; COZZOLINO, *et al.*, 2002). Para detectar a presença de leite de vaca em leite de ovelhas e de búfalas, além da adição de leite em pó no leite cru fresco (COZZOLINO, *et al.*, 2001; FANTON, *et al.*, 1998). Esta técnica tem sido também utilizada para determinar a proteólise em iogurte causada por cepas de *Lactobacillus delbrueckii* ssp., *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (FEDELE, *et al.*, 1999).

MALDI-TOF-MS foi também empregada para identificar peptídeos de queijo Cheddar separados por RP-HPLC (BROADBENT, *et al.*, 1998; GOULDSWORTHY, *et al.*, 1996) e para quantificar peptídeo β -CN (f193-209) amargo em queijo fresco (SOERYAPRANATA, *et al.*, 2002a) assim como correlacionar a concentração de peptídeo β -CN (f193-209) com sabor amargo em queijo Cheddar (SOERYAPRANATA, *et al.*, 2002b). Em decorrência da versatilidade da técnica, a espectrometria de massa tem sido utilizada para determinar a massa molecular das proteínas do leite de vaca (LEONIL, *et al.*, 1995), ovelha e cabra (TRUJILLO, *et al.*, 2000), assim como na identificação de variantes genéticas do leite (FERRANTI, *et al.*, 1995; VISSER, *et al.*, 1995), além das alterações na composição dos aminoácidos e modificações como fosforilação e glicosilação (CHIANESE, *et al.*, 1993).

Devido à excepcional especificidade molecular, alta sensibilidade de detecção e versatilidade na determinação das estruturas de compostos desconhecidos, as técnicas de espectrometria de massa estão desempenhando papéis cada vez mais importantes na caracterização de peptídeos (DASS, 2000). No entanto, para a análise de misturas complexas de compostos, tornou-se essencial combinar MS com um dispositivo de separação de alta resolução, tal como HPLC. Esta combinação on-line tornou-se uma ferramenta indispensável para identificação seletiva de peptídeos (GÓMEZ-RUIZ, *et al.*, 2004), principalmente com atividade biológica.

3.4.4. PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE BIOLÓGICA

As proteínas que ocorrem naturalmente nas matérias-primas alimentares exercem sua ação fisiológica direta ou mediante hidrólise enzimática *in vitro* ou *in vivo*. As proteínas da dieta fornecem uma rica fonte de peptídeos biologicamente ativos. Esses peptídeos são inativos dentro da proteína, e pode ser liberado de três formas: através da hidrólise pelas enzimas digestivas; através da hidrólise proteolítica por microorganismos e através da ação de enzimas proteolíticas provenientes de microorganismos. Peptídeos fisiologicamente ativos são produzidos a partir de várias proteínas do alimento durante a digestão gastrointestinal e fermentação de alimentos por bactérias ácido lácticas (KORHONEN; PIHLANTO, 2006; KORHONEN, 2009).

Proteólise é considerada como um processo bioquímico complexo que libera peptídeos, contribuindo para o desenvolvimento de textura e sabor durante a maturação que ocorre em algumas variedades de queijo. Agentes proteolíticos provêm de três fontes no leite e derivados: matéria-prima, coalho e microflora que incluem bactérias lácteas do *starter* e microflora secundária (MCSWEENEY, 2004; SOUSA, *et al.*, 2001). Peptídeos bioativos têm sido definidos como segmentos de proteínas específicas que tenham um impacto positivo sobre as funções do corpo e pode vir a influenciar a saúde (KITTS; WEILER, 2003). Após a administração oral, peptídeos bioativos, podem afetar os principais sistemas do organismo, como: cardiovascular, digestivo, imunitário e nervoso. Efeitos benéficos para a saúde podem ser atribuídos a inúmeras seqüências peptídicas conhecidas exibindo, por exemplo, antimicrobianos, antitrombóticos, anti-hipertensivos, imunomoduladores e antioxidante (FITZGERALD; MEISEL, 2003; KORHONEN; PIHLANTO, 2003a; SHIMIZU, 2004). A atividade é baseada em sua inerente composição de aminoácido e seqüência. O tamanho das seqüências de ativos pode variar de dois a vinte resíduos de aminoácidos, e muitos peptídeos são conhecidos por revelar propriedades multifuncionais (MEISEL; FITZGERALD, 2003).

Hoje, as proteínas do leite são consideradas as mais importantes fontes de peptídeos bioativos e um número crescente desses peptídeos têm sido identificados em proteínas do leite hidrolisado e produtos, tais como diferentes variedades de queijo e leites fermentados (FITZGERALD, *et al.*, 2004; KORHONEN;

PIHLANTO 2003b e 2003c; KORHONEN; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 2004; MEISEL, 2001 e 2004; SILVA; MALCATA, 2005). SAITO *et al.* (2000) encontraram peptídeos com atividade inibidor da ECA em queijo Gouda, mesma atividade encontrada por GOMEZ-RUIZ *et al.* (2002) em queijo Manchego. Vários outros estudos revelaram potencial anti-hipertensivo de peptídeos em queijo (BÜTIKOFER, *et al.*, 2008; GÓMEZ-RUIZ, *et al.*, 2002; GUPTA, *et al.* 2009; ONG; SHAH, 2008; TONOUCI, *et al.*, 2008). Estudos com queijo Cheddar mostraram atividade anti-hipertensivas, imunomoduladoras, opióides, antimicrobianas e antioxidantes (DIONÍSIO, *et al.*, 2000; PRITCHARD, *et al.*, 2010). Portanto, o leite e seus derivados principalmente queijos, após processamento e conseqüentemente hidrólises apresentam-se com uma fonte inigualável de moléculas bioativas de grande atividade biológica.

4- METODOLOGIA

4.1 ESCOLHA DAS QUEIJARIAS – DEMARCAÇÃO E LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA

Após um levantamento histórico da comprovação da fama do queijo Coalho do Jaguaribe foi realizado um estudo geográfico com mapeamento das bacias leiteiras do Estado do Ceará, seguido da localização precisa das queijarias na área geográfica delimitada no Vale do Jaguaribe. As queijarias identificadas na área geográfica fazem parte da Associação dos Produtores de Leite e Derivados do Jaguaribe (Queijaribe), já que esse é um pré-requisito para ter um produto com IG. A seleção das queijarias para fazer parte do estudo foi iniciada em 2008 com 16 queijarias, por meio de questionário (Apêndice A), para conhecimento das condições de produção dos queijos. Durante este diagnóstico realizou-se o acompanhamento do processamento do queijo Coalho das queijarias selecionadas com o intuito de identificar precisamente o processo utilizado pelos mestres queijeiros.

As coletas dos queijos foram realizadas após diagnóstico nos anos de 2009 e 2010, com 10 queijarias, localizadas na área delimitada. As seis queijarias adicionais também identificados em 2008 foram eliminadas do projeto, por apresentarem pequena produção, e por opção de não participarem do projeto ou por não apresentarem um produto dentro das características do queijo tradicional de Jaguaribe.

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE QUEIJO COALHO

Na área delimitada um total de 160 amostras de queijo Coalho das 10 queijarias trabalhadas, foi coletado durante dois anos (2009 e 2010). As coletas foram realizadas no dia da fabricação, embaladas e identificadas, individualmente, em embalagem plástica acondicionadas em caixas térmicas e transportadas ao laboratório de análise de alimentos da Embrapa Agroindústria Tropical sendo divididas em 2 lotes. O primeiro lote de amostras foi congelado a -20 °C para posteriores análises proteômicas e bioquímicas (Eletroforese, HPLC e sequenciamento). O segundo lote foi analisado quanto aos aspectos físico-químicos.

4.3 TREINAMENTO SENSORIAL DOS PRODUTORES DE QUEIJO COALHO DE JAGUARIBE PARA PADRONIZAÇÃO DO QUEIJO COM POTENCIAL PARA RECEBER O SELO DE INDICAÇÃO GEOGRÁFICA

Os produtores de queijo Coalho das 10 queijarias selecionadas receberam treinamento durante os anos de 2009 a 2011. Mensalmente um especialista na área de análise sensorial reuniu os produtores para o treinamento, no qual os produtores foram selecionando as características dos queijos produzidos na região. A avaliação sensorial dos atributos do queijo coalho do Jaguaribe, através da Análise Descritiva Quantitativa Modificada, usando uma escala não estruturada de 1 a 7 cm (STONE, *et al.*, 1974).

No início do treinamento os produtores receberam informações sobre alguns aspectos da análise sensorial, como a identificação dos atributos sensoriais de aparência, textura, aroma e sabor, sensação da boca e residual, os mecanismos fisiológicos da percepção sensorial, testes de reconhecimento de odor (padrões de odores característicos para queijo) e sabor com soluções quimicamente puras de gostos básicos: doce (2% de sacarose), ácido (0,07% de ácido cítrico), salgado (0,2%) de cloreto de sódio) e amargo (0,07% de cafeína) (GURGEL, *et al.*, 2000), água e bolacha água e sal para limpeza da boca entre as avaliações.

Os queijos coalhos artesanais utilizados no treinamento dos produtores para definir os padrões do queijo Coalho do Jaguaribe foram adquiridos no comércio de Fortaleza e dos produtores das 10 selecionadas. Os treinamentos foram feitos observando os horários equidistantes das refeições, a disponibilidade de tempo e responsabilidade dos produtores. Os queijos foram avaliados a temperatura ambiente em seus parâmetros externos (formato, tamanho, peso, cor, acabamento). Posteriormente os queijos foram cortados, para avaliação dos parâmetros de textura, odor consistência e sabor. Como o queijo Coalho do Jaguaribe não possui características sensoriais definidas, foi solicitado aos produtores que descrevessem livremente as diferenças e as semelhanças percebidas entre os queijos com relação a aparência, aroma, sabor e textura. A partir dos termos individuais foi elaborada uma lista contendo os termos descritivos que foram associados à frequência com que foram mencionados. Discussões foram realizadas com o grupo, visando avaliar os termos levantados, agrupar os semelhantes, selecionar o termo representante de

cada grupo e decidir pela eliminação daqueles que não foram percebidos pela maioria dos produtores. A partir da lista com os termos selecionados, montou-se uma ficha (Apêndice B) com a qual os produtores passaram a avaliar os queijos na sua produção diária visando a padronização dos mesmos de acordo com os parâmetros definidos pelos próprios produtores, baseados na fama e reputação do queijo jaguaribano.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO QUEIJO COALHO DE JAGUARIBE-CE

As análises dos parâmetros: teor de gordura, cinzas, umidade, pH e acidez foram realizadas de acordo com metodologias oficiais segundo AOAC (2000).

4.5 CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA DO QUEIJO COALHO DE JAGUARIBE

4.5.1 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE)

A metodologia utilizada foi adaptada de Egito *et al.* (2002) onde a SDS-PAGE foi realizada mediante géis com concentração de 5%, em tampão Tris-HCl, pH 6,8, e géis de separação com 15% de poliacrilamida, em tampão Tris-HCl, pH 8,8, contendo 0,1% de SDS a 10%. Uma amostra de 2 mg de queijo, foi dissolvida em 800 μ L de tampão tris HCl, pH 6,8, na presença de 0,1% de SDS e 5% de β -mercaptoetanol, sendo agitadas em vortex até dissolver. Em seguida, foram aquecidas em banho-maria à 100°C por 3 minutos e adicionadas de 200 μ L de azul de bromofenol (0,015%) com glicerol 50%. Volumes de 40 μ l (2mg/mL) foram depositados em cada poço do gel. O padrão de pesos moleculares utilizado foi o Bio-Rad (Hercules, CA, USA), contendo miosina (200,0 kDa), β -galactosidase (116,2 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (31,0 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,5

kDa) e aprotinina (6,5 kDa). As amostras aplicadas no gel foram submetidas a migração em um aparelho de eletroforese vertical (Modelo 2001 - Amersham-Pharmacia, Uppsala, Suécia) com dupla placas, a 4 °C, com condições elétricas de 500V, 60 mA e 30 W por gel usando Tris-glicina pH 8,3 (Tris 0,025M, glicina 0,192M, SDS 0,1%) como tampão de corrida.

Após o término da corrida, as proteínas foram coradas com 0,1% (p/v) de Coomassie Brilliant Blue (R-250), dissolvidos em 50% (v/v) de etanol e 1% de ácido tricloroacético (TCA), por cerca de 4h. A descoloração foi realizada overnight em uma solução de 30% (v/v) de etanol e 7,5% (v/v) de ácido acético, sendo então escaneados e posteriormente, os géis ainda foram submetidos a revelação por nitrato de prata, segundo protocolo adaptado por Blum *et al.* (1987).

Os géis foram submetidos a três ciclos de lavagem com água ultra pura, sob agitação, por cerca de 20 minutos cada ciclo, para remover o excesso de etanol, seguido da adição de aproximadamente 200 mL de tiosulfato de sódio 0,02% (p/v) durante um minuto. Após lavagem com água ultrapura, os géis foram imersos em solução contendo aproximadamente 200 mL de nitrato de prata 0,1% (p/v) por 30 minutos, sob agitação e ao abrigo da luz, logo em seguida, foram lavados com água ultrapura por 1 minuto. As proteínas foram reveladas utilizando uma solução de carbonato de cálcio 12% (p/v), 40 µL de tiosulfato de sódio 2% (p/v) e 200 µL de formaldeído sob agitação até a completa visualização das bandas e *spots*. A reação foi parada com solução de ácido acético 5% (v/v), finalizando assim o processo de coloração e em seguida os géis foram escaneados.

4.5.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE URÉIA (UREIA-PAGE)

Para uréia-PAGE, o procedimento foi o adaptado de Sanogo *et al.* (1989), com 8,2% de poliácridamida em 75mM de Tris-HCl e pH 8,9 na presença de 4M de uréia. Uma alíquota de 2 mg de queijo, foi dissolvido em 1000 µL de tampão tris HCl, pH 6,8, na presença de 0,1% de SDS e 5% de β-mercaptoetanol, azul de bromofenol com glicerol 50% agitar em vortex até dissolver. Volumes de 40µL (2mg/mL) foram depositados em cada poço do gel. As amostras aplicadas no gel foram submetidas a

migração em um aparelho de eletroforese vertical (modelo 2001 - Amersham-Pharmacia, Uppsala, Suécia) com dupla placas, a 4 °C, com condições elétricas de 500V, 60 mA e 30 W por gel usando Tris-glicina pH 8,3 como tampão de corrida.

Após a corrida, os géis foram submetidos à coloração azul Coomassie R-250, submetido à descoloração e posterior coloração de prata, conforme descrito acima no item 4.5.1.

4.5.3 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL ACOPLANDO IEF E SDS-PAGE

O 2D-PAGE acoplamento IEF e SDS-PAGE foi adaptado a partir do método de Egito *et al.* (2002). Para a primeira dimensão (IEF), a amostra de queijo (50 mg) foi dissolvido em 250 µL de uma solução contendo 8 M de ureia, CHAPS 2%, IPG 2%, azul de bomofenol 1%, DDT 0,3%. Para a focalização isoeletrica tiras de géis com gradiente de pH imobilizado de 24 cm e pH 3-10(IPG pH ReadyStrip 3-10, Bio-Rad) foram rehidratadas nessa solução por 16 horas a temperatura ambiente. A focalização foi realizada no sistema Ettan IPGphor System (GE Healthcare) com a seguinte programação: 5 minutos a 300 V, 1:30 horas a 3500 V, 4 horas e 10 minutos a 3500 V (gradiente). Para a separação na segunda dimensão, as tiras de géis foram incubadas por 15 minutos em solução de equilíbrio (6 M de uréia, 50 mM de Tris-HCL pH 8,8, 30% de glicerol, 2% de SDS e 0,002% de azul de bromofenol) contendo 1% de DTT e posteriormente, incubadas em solução de equilíbrio contendo 2,5% de iodoacetamida por mais 15 minutos. O IPG-strip foi encaixado no topo do gel de concentração de SDS-PAGE utilizando o tampão de agarose fundida. A separação das proteínas e coloração dos géis na segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida a 12,5% com 1,5 mm de espessura usando a metodologia do SDS-PAGE descrito no item 4.5.1.

4.5.4 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL ACOPLANDO UREIA-PAGE E SDS-PAGE

Adaptou-se o método descrito por Egito *et al.* (2002). Para acoplamento 2D-PAGE de ureia-PAGE e SDS-PAGE. A primeira dimensão (ureia-PAGE) foi

realizada com gel de 1,0 mm de espessura, feito de acordo com metodologia Ureia-PAGE, citada acima. Após a corrida, uma tira de gel contendo as proteínas de interesse foi excisada e equilibrou-se durante 15 minutos em tampão de 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, contendo 0,1% (p / v) de SDS. Após a sua inserção na parte superior do gel de 1,5 mm da espessura SDS-PAGE (segunda dimensão), a tira de gel foi incorporado ao gel utilizando agarose a 1% (p / v), fundida em tampão de eletrodo contendo glicina 0,192 M e 0,1% (p / v) de SDS e ajustada a pH 8,3 utilizando tampão Tris.

4.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA-RP-HPLC (COLUNA C18)

4.6.1 EXTRAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SOLÚVEIS EM ÁGUA

Amostras de queijo (10 g) foram homogeneizadas em 50 mL de água ultrapura em homogeneizador tipo stomacher (Seward 400C), a 200 rpm por 1h, seguido de centrifugação realizada 3 vezes consecutivas a 4°C (Biofuge Stratos), por 20 min a 4000 x g e o sobrenadante filtrado através de papel de filtro Whatman n^o 41. Os extratos contendo os peptídeos solúveis em água (PSA) foram congelados a -80 °C e liofilizados (Liotop L101) por 72 h. O extrato liofilizado foi, então, armazenado a -20°C para análise de peptídeos em cromatografia líquida de alta eficiência (RP-HPLC), segundo metodologia de Ong *et al.* (2007) com modificações descritas abaixo.

4.6.2 PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SOLUVEIS EM ÁGUA POR RP-HPLC EM COLUNA C18

Uma alíquota de 40 mg do PSA liofilizada foi dissolvida em 1 mL da solução a 10% de acetonitrila (Sigma-Aldrich), submetida a agitação lenta em vortex por 1h, e filtrada através de um filtro de 0,45 µm (Millipore Corp, Bedford, MA, EUA). Em seguida, a amostra foi submetida a cromatografia em fase reversa (RP-HPLC)

utilizando uma coluna Phenomenex LiChrospher C18 (250x4mm de diâmetro interno, 5-mm de tamanho de partícula, 10-nm de porosidade; Merck), conectada a um HPLC Varian ProStar. Volumes de 100 μ L contendo 4mg de peptídeos foram injetados na coluna com gradiente linear 5 a 50% (v/v) de acetonitrila, contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético (Sigma-Aldrich) durante 60 min com fluxo de 1 mL/min. A detecção foi realizada a 215nm em um detector Varian ProStar, detector UV - Vis.

Vinte e oito frações foram coletadas manualmente onde realizou-se 5 coletas para cada pico, sendo em seguida reunidas em uma única fração e liofilizadas (Liotop L101) para uma posterior repurificação. Após liofilização, acrescentou-se a cada fração a ser repurificada 800 μ L de acetonitrila 10%, onde a mesma foi agitada lentamente em vortex por 1h, e filtrada através de um filtro de 0,45 μ m (Millipore Corp, Bedford, MA, EUA). Cada fração foi injetada novamente em volumes de 100 μ L nas mesmas condições cromatográficas citadas anteriormente. A fração correspondente a cada pico foi recolhida manualmente, em seguida foram liofilizadas e armazenadas a -20°C para sequenciamento, utilizando espectrometria de massa MALDI TOF.

4.7 ESPECTROMETRIA DE MASSA POR MALDI - TOF

A massa molecular dos peptídeos fracionados por cromatografia de fase reversa foi determinada por espectrometria de massa MALDI-TOF usando um Ultraflex III e uma velocidade espectrômetros autoflex (Bruker Daltonics, Billerica, MA). Calibração de TOF foi realizada utilizando Péptido Calibrant II (Bruker Daltonics, Bilerica, MA). Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi recristalizado a partir de acetonitrilo aquoso e misturado com a matriz. A Matriz foi preparada com solução 5,0 x 10⁻² mol.L⁻¹ de H₂O: ACN: TFA (50:50:0,3, v:v:v). Amostras liofilizadas obtidas da purificadas por cromatografia de fase reversa, foram dissolvidas em 5 μ L de água ultrapura, e 1 μ L foi misturado com 3 μ L de solução de matriz e aplicada na placa de MALDI. As análises foram realizadas no modo de íon positivo refletida. Fragmentação foi realizada por MALDI-TOF-TOF usando a metodologia LIFT™ (SUCKAU, *et al.*, 2003) com os parâmetros do

instrumento, conforme determinado pela Bruker Daltonics tanto para Ultraflex III ou Autoflex Speed. O sequenciamento dos peptídeos foi realizado por interpretação manual, tendo em conta as clivagens preferenciais que ocorrem na ionização MALDI (PAIZS; SUHAL, 2005) e a ocorrência comum de fosforilação como uma modificação pós-translacional de caseínas (PALUMBO, *et al.*, 2011).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na caracterização físico-química a avaliação estatística foi realizada com o software estatístico SAS 9.2. Os resultados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA). Todas as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- CAPÍTULO 1

**LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA,
IDENTIFICAÇÃO DO PROCESSO DE
FABRICAÇÃO, AVALIAÇÃO SENSORIAL E
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO
QUEIJO COALHO DE JAGUARIBE-CE**

5.1 CAPÍTULO 1. LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA, IDENTIFICAÇÃO DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO, AVALIAÇÃO SENSORIAL E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

5.1.1 LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DAS QUEIJARIAS DA REGIÃO DE JAGUARIBE-CE

O queijo Coalho tem se destacado como um dos produtos lácteos mais aceitos pela população nordestina, sendo produzido em todos os estados do Nordeste. Em cada estado regiões específicas se destacam pela produção de queijos com características diferenciadas das demais regiões produtoras, o que ocasiona maior aceitação deste produto pelos consumidores destas regiões. No Estado do Ceará destaca-se de Jaguaribe como a mais conhecida e maior produtora de queijo Coalho.

A região de Jaguaribe tem se diferenciado das demais regiões do Ceará em decorrência da presença de uma das mais importantes bacias leiteiras do Estado e sua alta produção de leite, que tem favorecido o surgimento de inúmeras queijarias. Como primeiro passo para realização dos estudos dos queijos Coalhos produzidos na região de Jaguaribe foi realizado um mapeamento com a participação de geógrafos, destacando-se entre os levantamentos realizados a localização das regiões produtoras de leite do Estado do Ceará, a região de Jaguaribe e as queijarias objeto deste estudo presentes nesta região.

Como mostrado na Figura 1 a produção de leite do Ceará é localizada em todo o Estado, destacando-se 8 polos denominados: Alto Salgado, Cariri, Fortaleza, Inhamuns, Médio Jaguaribe, Quixeramobim, Sobral e Vale do Curú. A área delimitada (Figura 2) escolhida para o estudo é uma área que se sobressai pela tradição de produção e pela organização dos produtores de queijos em associação, estando esta região localizada nas bacias leiteiras do Médio Jaguaribe, Alto Salgado e Quixeramobim. Na região de Jaguaribe em decorrência da tradição na fabricação de queijos, as queijarias têm recebido incentivos para melhoria da qualidade e programas de autenticação de seus produtos tradicionais devido à sua origem

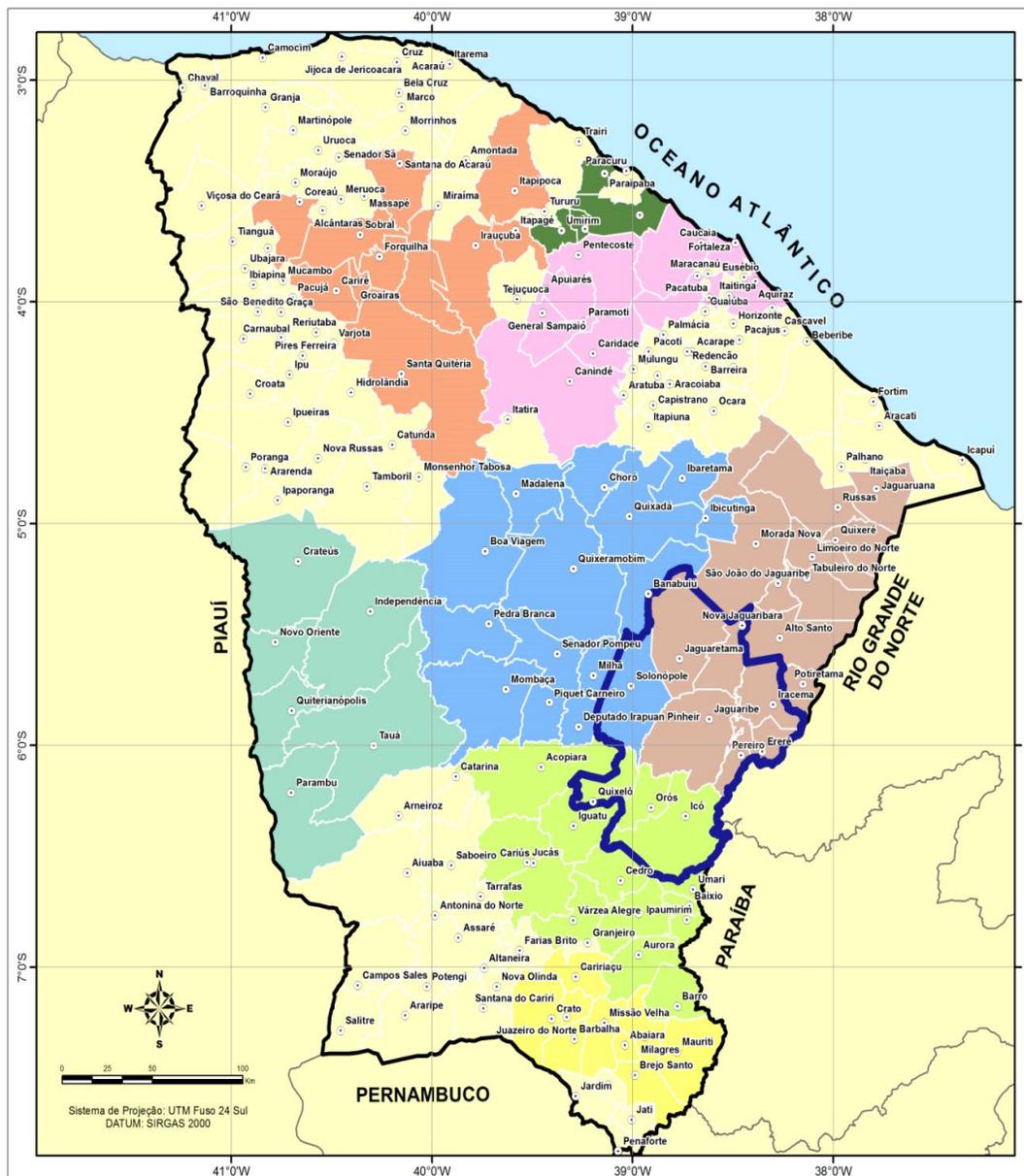
geográfica. Observa-se também que Jaguaribe está localizada no centro das maiores bacias leiteiras do Ceará (Figura 1), facilitando assim, a condição de recepção da matéria prima.

Através do estudo geográfico mostrado na Figura 2 foi possível localizar precisamente 10 queijarias selecionadas para realização deste estudo. A queijaria 1 está situada a S: 05° 56' 36,9'' W: 38° 53' 37,8''; queijaria 2 a S: 05° 56' 31,9'' W: 38° 50' 00,3''; queijaria 3 S: 05° 47' 72,4" W: 38° 31' 71,8"; queijaria 4 S: 05° 47' 64,8" W: 38° 32' 23,4"; queijaria 5 S: 05° 53' 65,2" W: 38° 37' 26,0"; queijaria 6 S: 05° 53' 40,0'' W: 38° 38' 50,2''; queijaria 7 S: 05° 54' 24,6'' W: 38° 54' 04,5''; queijaria 8 S: 06° 11' 07,2'' W: 38° 39' 27,9''; queijaria 9 S: 05° 49' 56,0'' W: 38° 40' 11,6'' e queijaria 10 situada a S: 05° 49' 56,6'' W: 38° 40' 11,6''.

Para seleção das queijarias foram aplicados questionários em 16 estabelecimentos, conforme modelo mostrado no Apêndice A destacando-se itens como: produção leiteira, instalações em geral, aspectos de controle de qualidade, tecnologia utilizada na fabricação dos queijos, aspectos mercadológicos, fornecedores de leite para as queijarias, características dos queijos, organização dos produtores, informações sobre o status das informações técnicas e de capacitação já ocorrida na região, condições de controle do produto final e envolvimento dos produtores em programas de melhoria da qualidade do queijo. Após aplicação dos questionários, os produtores foram orientados "in loco" sobre condições higiênico-sanitárias e outros procedimentos que promovem a qualidade do produto através de cursos. Após estes treinamentos observou-se que os produtores têm adotado várias inovações técnicas e organizacionais como: melhorias na estrutura da queijaria, uso de equipamentos em aço inoxidável, uso de sanitizantes, uso de botas, uniformes, toucas, uso de telas para evitar entrada de insetos, compra de equipamentos (analisador de leite ultrasônico) para fazer análise do leite a fim de obter um produto de melhor qualidade. Referidos critérios de qualidade foram utilizados para seleção de 10 produtores de queijos para participarem do estudo visando o processo de indicação geográfica.

Os estudos geográficos com localização precisa das queijarias revelaram grande importância para realização dos próximos passos do estudo de IG dos queijos produzidos em Jaguaribe.

Figura 1: Localização geográfica da produção de leite do Estado do Ceará.



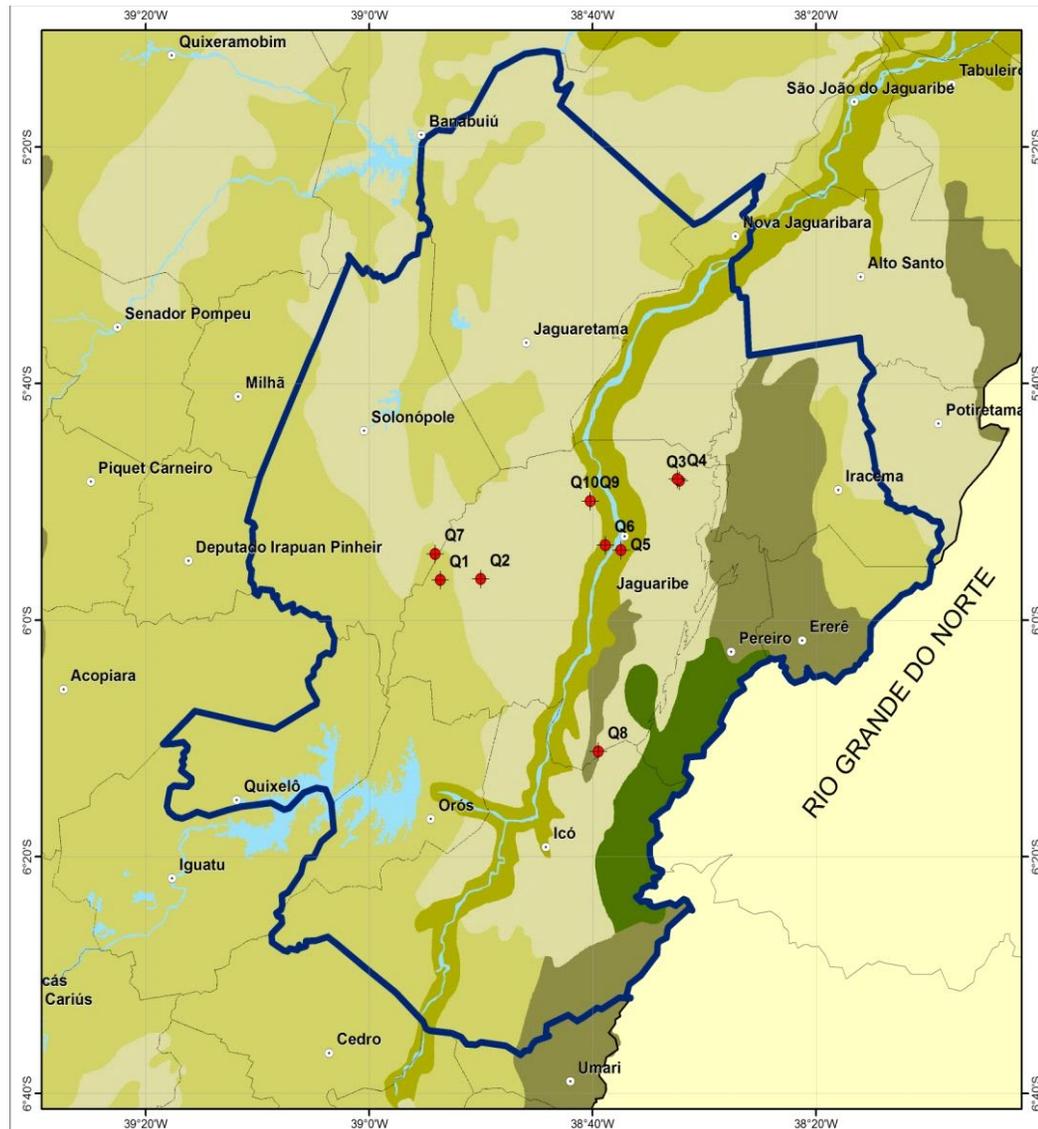
CONVENÇÕES

- Sede Municipal
- ☒ Limite do Estado do Ceará
- ☒ Limite dos Estados do Nordeste
- ☒ Limite da área de produção do queijo coalho

PÓLOS DE PRODUÇÃO DE LEITE

- Pólo Alto Salgado
- Pólo Cariri
- Pólo Fortaleza
- Pólo Inhamuns
- Pólo Médio Jaguaribá
- Pólo Quixeramobim
- Pólo Sobral
- Pólo Vale do Curú

Figura 2: Área delimitada da região do Jaguaribe com a localização das queijarias estudadas (♦). Q1 a Q10, queijarias selecionadas, que participaram do processo de Identificação geográfica.



CONVENÇÕES

- Sede Municipal
- ♦ Queijrias
- ⬭ Limite Municipal
- ⬭ Limite do Estado do Ceará
- ⬭ Limite dos Estados do Nordeste
- ⬭ Limite da área de produção do queijo coalho

UNIDADES FITOECOLÓGICAS

CLASSES

- Caatinga Arbustiva Aberta
- Caatinga Arbustiva Densa
- Floresta Caducifolia Espinhosa (Caatinga Arbórea)
- Floresta Mista Dicotilo-Palmaceae (Mata Ciliar com Carnaúba)
- Floresta Subcaducifolia Tropical Pluvial (Mata Seca)

5.1.2 IDENTIFICAÇÃO DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO DO QUEIJO COALHO DE JAGUARIBE-CE E AVALIAÇÃO SENSORIAL

Entre os fatores a serem observados visando o processo de IG de um produto alimentar destacam-se o processo de fabricação “saber fazer”, que é passado de geração em geração diferenciando o produto dos outros similares e as características físicas e sensoriais do produto, para obtenção de uma futura “padronização” que destaque este produto dos demais existentes no mercado.

Para realização da identificação do processo de fabricação utilizado na região de Jaguaribe foram inicialmente aplicados questionários nas 16 queijarias selecionadas inicialmente, e de acordo com as respostas extraídas do questionário (Apêndice A) e das observações visuais durante a produção do queijo Coalho consolidou-se o fluxograma de produção do queijo Coalho artesanal de Jaguaribe, conforme mostrado na Figura 3 e descrito abaixo:

- **Recebimento e filtragem:** O leite integral chega em latões, é filtrado em pano de algodão e/ou peneira de malha fina de material plástico ou inox, para remoção de possíveis impurezas que tenham ocorrido durante a ordenha e acondicionado no tanque de fabricação (Figura 4 A).
- **Adição do coalho:** A adição do coalho industrial é feita de acordo com a quantidade recomendada pelo fabricante. O coalho dissolvido em água é adicionado e misturado ao leite durante 1 a 2 minutos para melhor homogeneização do produto (Figura 4 B).
- **Coagulação:** Após a adição do coalho o leite fica em repouso por 35 a 45 minutos, para completa coagulação (Figura 4 C).
- **Corte da coalhada:** Inicialmente é necessário verificar o ponto de corte, através da introdução de uma faca ou dedo indicador, puxando a coalhada para cima e para frente. A coalhada está no ponto quando a superfície se rompe em linha reta. O corte é feito com facas e/ou liras, onde a coalhada é cortada em cubos (grãos) com cerca de 2 cm de aresta (Figura 4 D).

- Primeira mexedura: Após o corte é feito uma mexedura lenta com o auxílio de utensílios denominados palheta ou globo, seguida por repouso de 3 a 5 minutos para a massa decantar (Figura 4 E).
- Primeira dessora: Retira-se cerca de 25% do volume do soro para aquecimento. O soro quente é retornado tanque de coagulação para aquecimento da massa (Figura 4 F).
- Segunda mexedura: Após a primeira dessora é feito uma nova mexedura de forma lenta com o auxílio de utensílios com palheta ou globo. Repouso de 3 a 5 minutos para a massa decantar (Figura 4 E).
- Segunda dessora: Após o repouso da segunda mexedura é novamente retirado cerca de 50% do volume do soro; desses, cerca de 30% é aquecido e retorna para aquecimento da massa. Algumas queijarias fazem apenas duas dessoras, a primeira dessora ocorre conforme descrito acima e a segunda removem aproximadamente 90% do soro (Figura 4 F).
- Aquecimento da massa: O soro ou água são aquecidos até 60 °C para aquecimento da massa, até obter temperatura da massa entre 45 e 55 °C. O ponto de aquecimento da massa é dada até que os grãos estejam consistentes, quando pressionados na mão, formem um bloco de massa que, ao ser quebrado com os dedos, forme pequenos grãos. Algumas queijarias fazem o aquecimento no próprio tanque com vapor direto (Figura 4 G).
- Terceira mexedura: Durante a etapa de aquecimento da massa é realizada mexedura constante para que a massa seja aquecida de modo uniforme. Repouso de 3 a 5 minutos para a massa decantar (Figura 4 E).
- Terceira dessora: Após o aquecimento da massa é removido aproximadamente 90% do soro. Sendo o processo similar ao mostrado na figura 4 F.
- Salga: É feita direto na massa. A quantidade de sal utilizada é de aproximadamente 0,6 a 1% (Figura 4 H).

- Enformagem e prensagem: É feita em formas redondas com capacidade variando entre 900 g a 1000 g, (Figura 4 I). Em seguida, realiza-se a prensagem, que varia de 6 a 12 horas. Durante a prensagem faz-se a viragem do queijo. As queijarias que prensam por 6 horas fazem apenas uma viragem após 30 minutos de prensagem, enquanto as queijarias que prensam por 12 horas fazem duas viragens, a primeira após 30 minutos e a segunda após 6 horas (Figura 4 J).
- Armazenamento: Após 6 ou 12 horas de prensagem os queijos são desenformados e seguem para armazenamento refrigerado. Algumas queijarias armazenam os queijos em câmara fria, enquanto outras o armazenamento é realizado em refrigerador com temperaturas de 5° C a 12° C (Figura 4 K).
- Embalagem: A embalagem do queijo é feita no momento da expedição. Algumas queijarias utilizam a embalagem a vácuo, que garante padrões mais elevados de conservação (Figura 4 L).

Figura 3: Fluxograma de produção de queijos Coalho artesanal da região de Jaguaribe-CE.

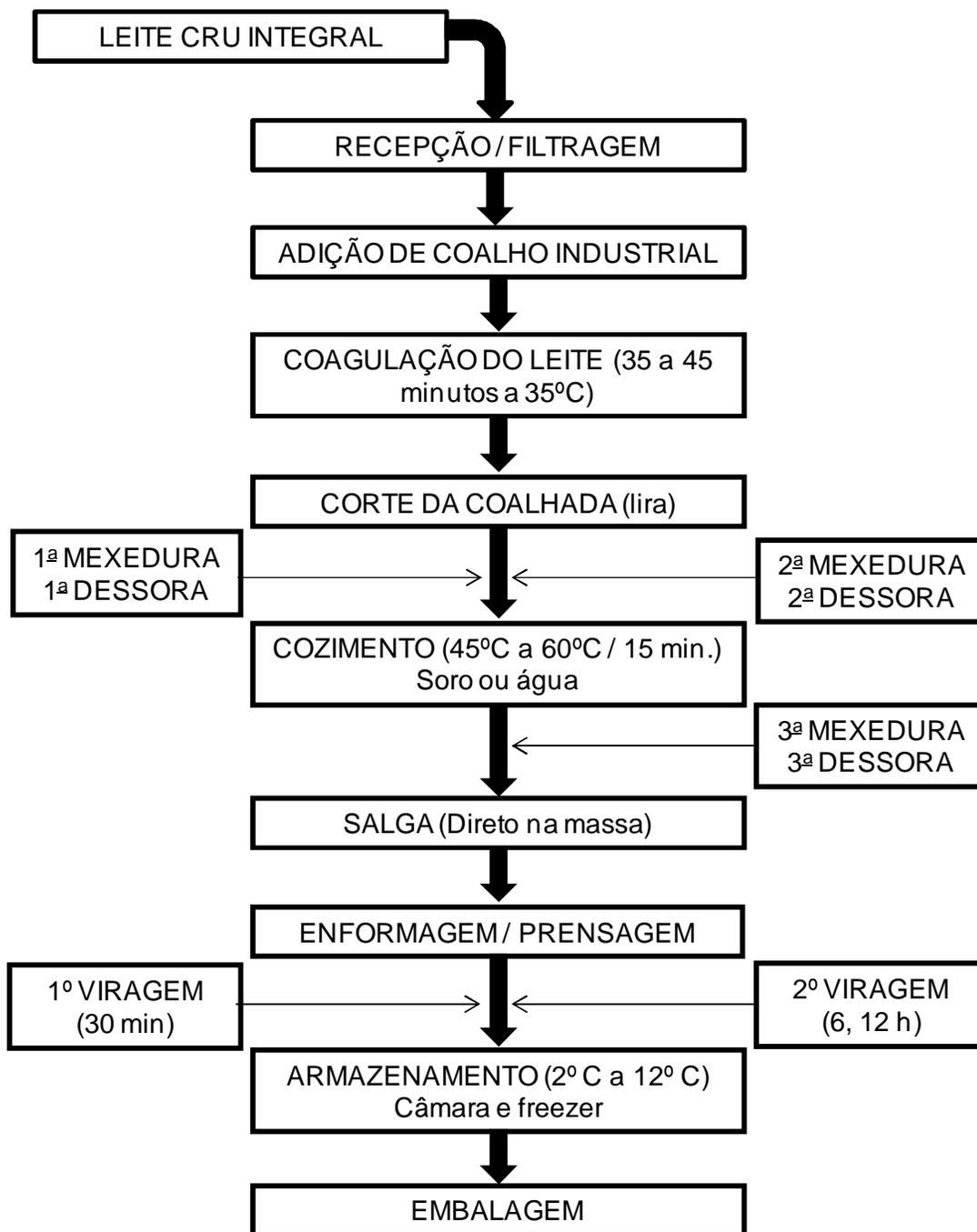


Figura 4: Etapas do processamento do Queijo Coalho produzido na região de Jaguaribe- CE. (A) Recepção e filtragem, (B) Adição do coalho, (C) Coagulação do leite, (D) Corte da coalhada, (E) Mexedura, (F) Dessora.



Figura 4: Etapas do processamento do Queijo Coalho produzido na região de Jaguaribe- CE. (G) Aquecimento da massa, (H) Salga, (I) Enformagem, (J) Prensagem, (K) Armazenamento refrigerado, (L) Embalagem.



Após a identificação do processo utilizado nas queijarias da área demarcada iniciou-se a caracterização sensorial dos queijos da região de Jaguaribe.

Segundo a Instrução Normativa nº 30 (BRASIL, 2001), dentre os atributos sensoriais que o queijo Coalho deve apresentar estão a consistência semidura, elástica; cor branca amarela uniforme; crosta fina, sem trincas, não sendo usual a formação de casca bem definida; odor ligeiramente ácido, lembrando massa coagulada; sabor brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado; textura compacta, macia com algumas olhaduras pequenas ou sem olhaduras. O formato e peso podem ser variáveis.

De acordo com a descrição do processamento citado anteriormente o queijo Coalho possui etapas divergentes entre produtores principalmente pelo fato de tratar-se de um produto artesanal, o que origina queijos com cores, formatos e até sabores diferentes. Por exemplo, o tempo de coagulação e mexedura da massa, que pode variar em decorrência da qualidade do leite, em função do aquecimento da massa logo após a coagulação, número de mexeduras e número de dessora que variam de 1 a 3. Portanto, durante o acompanhamento e descrição do processo observaram-se queijos de diferentes cores e formatos entre as 16 queijarias estudadas. Na Figura 5 pode-se observar queijos com formato arredondado (A), redondo (B e C), quadrado (D e E), retangular (F), em cores branca, amarela com intensidades mais claras e mais escuras.

Em decorrência destas observações uma nova etapa foi realizada buscando juntamente com os produtores de queijos e mestres queijeiros da região identificar as características do tradicional queijo de Jaguaribe. Inicialmente realizou-se treinamento sensorial dos participantes, conforme mostrado na Figura 6, visando identificar um padrão definido pelos próprios produtores de acordo com a tradição desse queijo e as preferências dos seus clientes, de como eles reconhecem o queijo da região de Jaguaribe, tendo uma forma, cor e sabor diferenciado.

Figura 5: Queijos Coalhos produzidos na região de Jaguaribe- CE com aproximadamente 3 dias de produção e diferentes formatos e cor. (A) Queijos formato “arredondado” cor branca, (B) Queijo Formato redondo amarelo claro e excesso de manchas brancas, (C) Queijo formato redondo amarelo claro com poucas manchas brancas, (D) Queijo formato quadrado cor branca, (E) Queijo quadrado amarelo claro, (F) Queijo retangular amarelo claro.

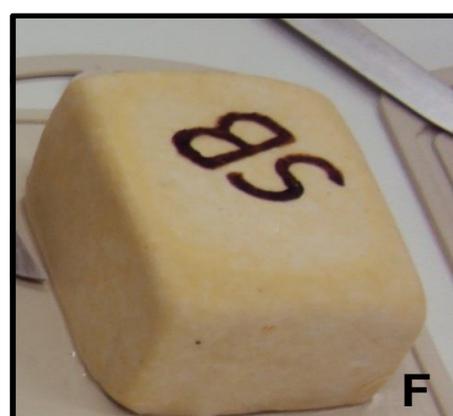
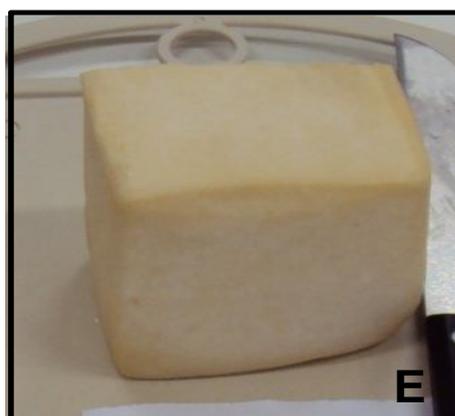
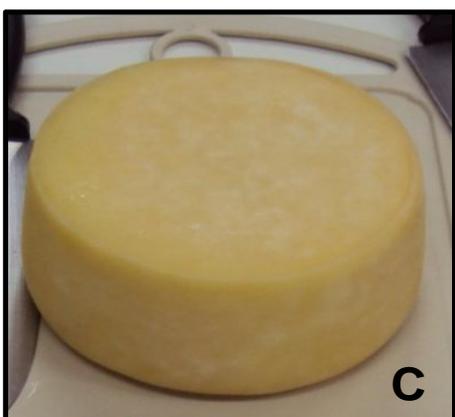
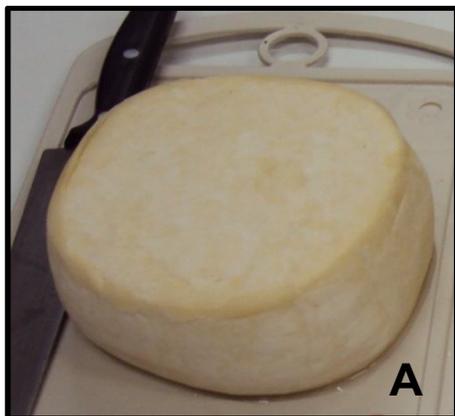
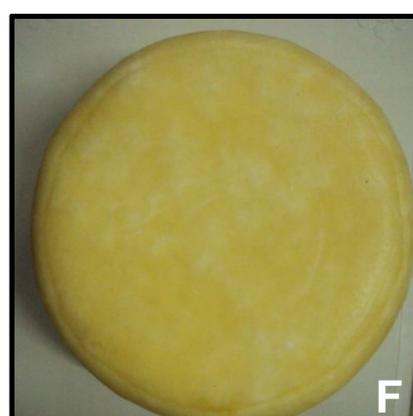


Figura 6: Treinamento sensorial para padronização do queijo Coalho produzido na região de Jaguaribe-CE. (A) Avaliação do odor, (B) Avaliação do formato, (C) e da cor (D) Avaliação das formas e cores diferentes, (E) Preenchimento da ficha de avaliação, (F) Queijo com as características desejadas para o queijo Coalho de Jaguaribe-CE.



Após análises sensoriais dos queijos produzidos nas 16 queijarias inicialmente estudadas foi possível identificar termos selecionados em consenso entre os produtores e mestres queijeiros referentes à aparência, consistência, odor, textura e sabor dos queijos produzidos na região conforme especificados no Quadro 1. Após discussão com a equipe para ajuste das similaridades e remoção das divergências obteve-se o Quadro 2 que mostra a lista final com a terminologia descritiva desenvolvida para o queijo Coalho do Jaguaribe onde estão definidos os atributos sensoriais: Formato, tamanho, peso, cor, acabamento, textura, odor, consistência e sabor desejável para o queijo da região. Estes resultados foram obtidos através da ficha de avaliação descritiva do queijo Coalho de Jaguaribe (Apêndice B), com os termos e suas respectivas escalas de 7 pontos, onde nos extremos estão os termos de intensidade escolhidos consensualmente, sendo possível após análise sensorial identificar o queijo característico de Jaguaribe.

O treinamento sensorial permitiu que os produtores se tornassem mais exigentes quanto à qualidade dos queijos, aplicando este padrão nas suas queijarias e visando obter um produto mais homogêneo de acordo com os parâmetros definidos por eles, parâmetros esses que são apreciados pelos consumidores do tradicional queijo Coalho de Jaguaribe, permitindo ainda nesta fase do projeto definir quais queijarias estariam dentro do padrão para permanecer no estudo.

Quadro 1: Termos selecionados inicialmente em consenso por produtores e mestres queijeiros.

TERMOS	
APARÊNCIA	
Formato: Redondo Retangular Quadrado	Tamanho: - Diâmetro 12,5cm a 13cm. - Altura 6,5cm a 7cm.
Peso: 900g a 1Kg	Cor: Amarelo claro com tolerância de manchas mais claras. Branco com manchas amarelas
Acabamento: - Liso na parte superior e lateral - Quina levemente arredondada - Lateral reta	- Deve ficar enxuto (não ficar soltando soro) - Uniforme (superior)
CONSISTÊNCIA	
Firme: Na pressão do dedo o queijo volta a sua posição inicial. Flexível e uniforme: Não altera a sua forma original (resistente/ consistência uniforme/ não deforma).	Depois do corte: Massa lisa com algumas olhaduras (devido a prensagem). No interior tem olhaduras, mas não muitas.
CHEIRO / ODOR	
Agradável com leve cheiro de soro. Azedo Ácido agradável Leite	Agradável de leite cozido com cheiro suave Manteiga Leite cozido
TEXTURA	
Macio (leve rangido) Duro Firme	Rígido Mole Sem Resistência
SABOR	
Levemente salgado Coalhada Leve acidez Leite cozido Ácido agradável	Azedo Salgado Suave Fumaça

Quadro 2: Padrões sensoriais do queijo Coalho de Jaguaribe-CE escolhidos pela equipe.

FORMATO	Redondo
TAMANHO	Diâmetro 12,5 a 13 cm Altura 6,5 a 7 cm
PESO	0,900 Kg a 1Kg
COR	Amarelo claro com tolerância de manchas claras
ACABAMENTO	Parte superior lisa Lateral reta Borda superior arredondada Borda inferior reta Leve umidade externa
TEXTURA	Flexível e Uniforme Pós corte: Massa lisa com tolerância de algumas olhaduras
CHEIRO / ODOR	De leite cozido / manteiga Acido agradável
CONSISTÊNCIA	Macio com leve rangido
SABOR	Leite cozido / coalhada Leve acidez / acidez agradável Levemente salgado

5.1.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO QUEIJO COALHO DE JAGUARIBE-CE

O conhecimento da composição química dos produtos alimentícios é fator de suma importância para a caracterização e controle de qualidade dos mesmos. Baseados nesta premissa, queijos Coalhos provenientes dos 10 produtores selecionados de acordo com a localização geográfica, processo de fabricação e características sensoriais definidas para o queijo de Jaguaribe foram submetidos a análises físico-químicas durante os anos de 2009 e 2010 com objetivo de verificar a qualidade dos queijos. Os resultados apresentados na Tabela 1 mostraram que houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os queijos analisados em 2009 e 2010 quando comparados os parâmetros acidez, pH e gordura. Não havendo diferenças significativas ($p \leq 0,05$) quanto as cinzas e umidade.

Esta diferença provavelmente está relacionada com a variação da matéria prima (leite) durante os anos de estudos, uma vez que a composição do leite está relacionada com parâmetros como raça do animal, estágio da lactação, alimentação, clima, estado de saúde, entre outros. Portanto, a qualidade do leite está totalmente relacionada com a composição do produto final (queijos), sendo estes fatores imprescindíveis para diferenciar a qualidade dos queijos fabricados nas diferentes regiões nordestina e em especial Jaguaribe. No entanto, os valores observados tanto em 2009 como 2010 são divergentes dos observados por Silva *et al.* (2010), que encontraram valores para umidade (45.5 e 51.5 g/100 g), gordura (36.6 e 48.2 g/100 g) e pH (5.99 e 7.13) em queijo Coalho de leite bovino, comercializado no Nordeste do Brasil.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos do queijo Coalho da região Jaguaribe-CE nos anos de 2009 e 2010.

Ano	Acidez (%)	pH (%)	Umidade (%)	Cinzas (%)	Gordura (%)
2009	0,38 ^A ± 0,20	6,04 ^A ± 0,32	42,33 ^A ± 3,73	4,12 ^A ± 0,59	27,61 ^A ± 2,99
2010	0,27 ^B ± 0,33	6,24 ^B ± 0,30	43,39 ^A ± 2,52	4,04 ^A ± 0,51	32,56 ^B ± 3,03
Padrão*	-	-	36 – 45,9	-	25 – 44,9

Os valores representam a média dos dez produtores (n = 10) por tratamento.

A e B letras distintas, na mesma coluna, diferem estatisticamente a 5% ($p \leq 0,05$) pelo teste F, ANOVA.

* Padrão estabelecido no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (Portaria 146/96-MAPA)

Os resultados das análises físico-químicas com os valores médios dos dez produtores durante os 2 anos estudados, desvio padrão, mínimo, máximo e coeficiente de variação de acidez, pH, umidade, cinzas e gordura, do queijo Coalho do Jaguaribe, são apresentados na Tabela 2. Valores divergentes foram observados por Ferreira e Filho (2008) com médias de umidade, acidez e cinzas de 36,37%, 1,47% e 4,31% respectivamente, em queijo Coalho comercializado em Barreiros-PE. Resultados semelhantes também foram observados por Nassu et al. (2001) que encontraram valores de 17,77 a 34,27 para gordura, 5,30 a 6,64 para pH, 36,37 a 49,53 para umidade, 3,45 a 5,96 para cinzas e 0,10 a 2,10 para acidez.

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos do queijo Coalho da região Jaguaribe-CE durante 2 anos.

Parâmetro	Mínima	Máxima	X ± S*	CV**
Acidez (%)	0,14	0,62	0,32 ± 0,27	84,87
pH	5,83	6,46	6,12 ± 0,26	4,26
Umidade (%)	38,00	46,31	42,94 ± 1,78	4,14
Cinzas (%)	3,50	4,79	4,11 ± 0,47	11,45
Gordura (%)	28,03	32,72	30,55 ± 2,54	8,32

* média das amostras ± desvio padrão

** coeficiente de variação = (desvio padrão / média) X 100

Os altos valores de CV (84,87) obtidos com relação à acidez provavelmente seja devido à qualidade microbiológica do leite e o processo de fabricação dos queijos. Ferreira e Filho (2008) e Souza Filho *et al.* (2010) também obtiveram altos valores de CV (50,34 e 30,43) para acidez do queijo Coalho de Pernambuco. A acidez é um fator de grande importância na qualidade dos queijos, uma vez que a mesma tem influência direta no pH e na expulsão do soro da massa durante a fabricação do queijo e na fase inicial da cura.

Evolução do pH das amostras do queijo de Jaguaribe variou de 5,83 a 6,46, valores próximos aos encontrados em estudo com queijos Coalho artesanais do Ceará por Andrade (2006), que variaram de 5,20 a 6,25 e queijo Coalho artesanal de Pernambuco por Souza Filho, *et al.* (2010) com valores variando de 5,20 a 6,50. O pH final do queijo é influenciado pelo processo de prensagem, pois de acordo com Furtado (1981), a prensagem pode reter maior ou menor quantidade de lactose, dependendo da força e do tempo de prensagem. De acordo com Bhaskaracharya e Shah (2001) os queijos produzidos com valores de pH mais baixos, principalmente próximos do ponto isoelétrico da caseína, possuem texturas com elevada gomosidade e queijos com valores de pH mais elevados apresentam uma textura mais plástica.

Com relação a variação da umidade (38,00 a 46,31), ela permite classificar o queijo Coalho do Jaguaribe como sendo de média umidade e massa semidura, conforme estabelecido no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (BRASIL 1996), que estabelece uma faixa de 36% a 45,9%, estando de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho (BRASIL, 2001). A umidade está correlacionada com o tempo de conservação do queijo e pode interferir na atividade de água, e nas ações metabólicas de microrganismos ao longo do armazenamento, com suas possíveis conseqüências na textura, pH, sabor e aroma do queijo (FERREIRA; FREITAS-FILHO, 2008).

O teor de cinzas encontrado nesse estudo variou de 3,5 a 4,7%, mostrando-se próximos ao encontrado por Andrade (2006) onde obteve variação de 3,59% a 5,47% em queijo Coalho do Ceará. O conteúdo de cinzas assim como o de proteínas está relacionado com a alimentação animal.

O teor de gordura das amostras variou de 28,03 a 32,72, permitindo classificar o queijo Coalho de Jaguaribe como queijo semigordo, conforme estabelecido no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (Portaria 146/96-MAPA), que estabelece uma faixa de 25% a 44,9%. Este indicador também influencia a textura, fatiabilidade, deformidade e derretibilidade do queijo e este último é importante para a cultura local, pois o queijo Coalho é muito consumido na forma assada.

A caracterização físico-química durante os dois anos de estudo forneceu mais um subsídio para identificar o queijo Coalho de Jaguaribe e auxiliar no processo de IG. Apesar das diferenças entre alguns parâmetros estudados e os existentes na literatura, o queijo Coalho de Jaguaribe encontra-se dentro dos parâmetros permitidos pela legislação brasileira (BRASIL, 1996).

5.2- CAPITULO 2

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
ELETROFORÉTICA DAS PROTEÍNAS DO
QUEIJO COALHO DE JAGUARIBE -CE**

5.2 CAPÍTULO 2. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA DAS PROTEÍNAS DO QUEIJO COALHO DE JAGUARIBE – CE

Eletroforese tem sido uma ferramenta bastante útil na caracterização, identificação e purificação de proteínas do leite e derivados bem como monitoramento da qualidade de leite ou dos processos de fabricação de derivados. Inúmeros estudos têm mostrado a eficiência desta metodologia para identificar mistura de leite de distintas espécies como adição de leite de cabra, vaca e ovelha (CATTANEO, *et al.*, 1996); leite de cabra com leite de vaca (EGITO, *et al.*, 2006); detectar adição do leite de vaca em queijos fabricados com leite de búfala (FALEIRO, 2013); verificar a susceptibilidade das caseínas equinas a hidrólises por quimosina (EGITO, *et al.*, 2001); verificar a atividade coagulante do leite e hidrólises da κ -caseína bovina com extratos vegetais (EGITO, *et al.*, 2007); acompanhar a proteólise de queijos durante a maturação (GAGNAIRE, *et al.*, 2001). Além da realização de mapas peptídicos de proteínas de leite (LINDMARK-MANSSON, 2005) e queijos (PAPPA, *et al.*, 2008; PISANU, *et al.*, 2012) entre outras aplicações.

Em decorrência destas inúmeras utilizações das técnicas eletroforéticas em leite e derivados realizou-se a caracterização eletroforética do queijo Coalho produzido na região de Jaguaribe. Para realização dos estudos foram coletadas inicialmente amostras das 16 queijarias na área demarcada através dos estudos geográficos mostrados no capítulo 1.

Buscando verificar o perfil geral das proteínas solúveis dos queijos produzidos nas queijarias da região, as amostras foram submetidas a eletroforeses em presença de SDS conforme mostrado na Figura 7 e 8. Inicialmente realizou-se uma coloração de Coomassie (7A e 8A) onde se pode observar o perfil característico das caseínas (CN) α_s , β e κ na região a 30 kDa e das proteínas majoritárias do lactossoro (LS) representadas pelas β -LG e α -LA na região a 15 kDa. Notamos ainda, nesta região a presença bem definida da para- κ -CN, peptídeo originado pela ação da quimosina através da hidrólise da Phe₁₀₅-Met₁₀₆ conforme descrito por Egito *et al.* (2007). Ao analisarem-se as amostras Q1 a Q8 (Figura 7) e Q9 a Q16 (Figura 8) verificou-se precisamente a presença das α_s -CN e β -CN sem grandes alterações com exceção da amostra 11 onde observou-se a diminuição da α_s -CN (*) quando comparada com as demais amostras.

Figura 7: Caracterização eletroforética (PAGE-SDS) de queijos Coalho produzidos na região de Jaguaribe-CE. Depósito de 40 μL de proteínas ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Revelação com azul de Coomassie (A) e prata (B). PM: Peso molecular padrão. CN: caseinato de sódio bovino; LS: Lactosoro; α_s -CN: α_{s1} + α_{s2} -caseínas; β -CN: β -caseína; κ -CN: κ -caseína; para- κ -CN: para- κ -caseína; β -LG: β -lactoglobulina; α -LG: α -Lactalbumina; Q1 a Q8: Amostras 1 a 8 dos queijos.

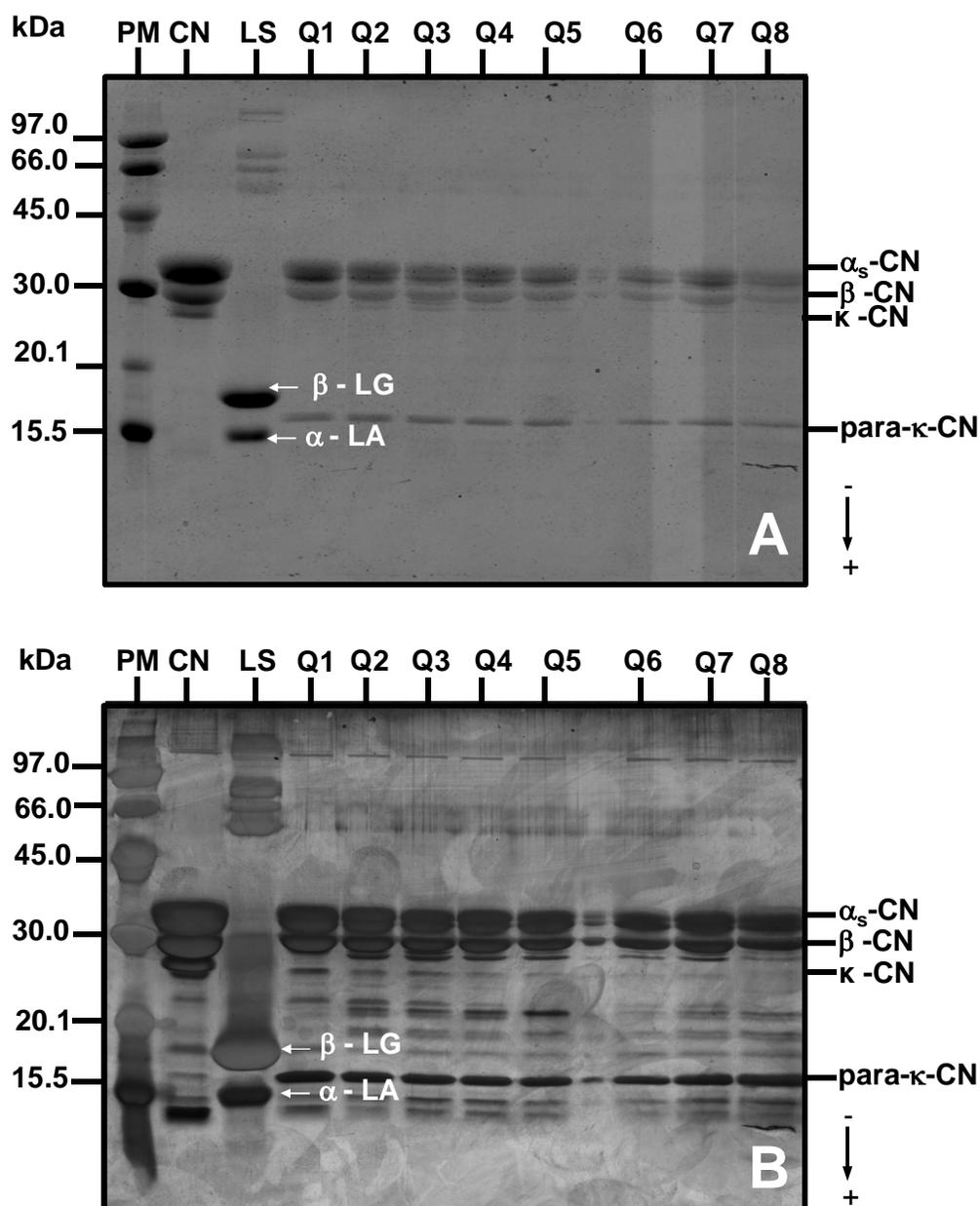
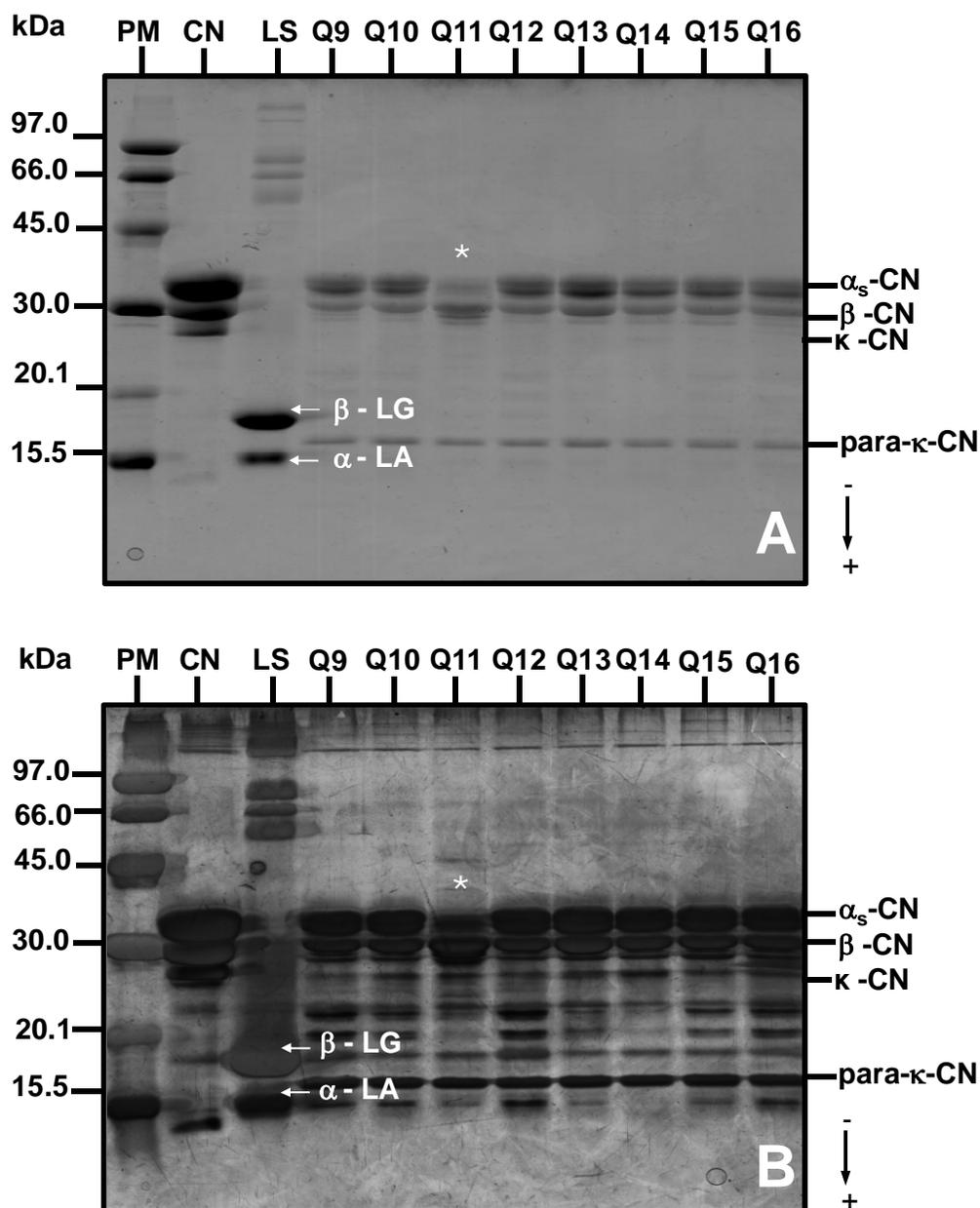


Figura 8: Caracterização eletroforética (PAGE-SDS) de queijos Coalho produzidos na região de Jaguaribe-CE. Depósito de 40 μL de proteínas ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Revelação com azul de Coomassie (A) e prata (B). PM: Peso molecular padrão. CN: caseinato de sódio bovino; LS: Lactosoro; α_s -CN: α_{s1} - + α_{s2} -caseínas; β -CN: β -caseína; κ -CN: κ -caseína; para- κ -CN: para- κ -caseína; β -LG: β -lactoglobulina; α -LG: α -Lactalbumina; Q9 a Q16: Amostras 9 a 16 dos queijos. * diminuição da α_s -CN.



Em decorrência de não se ter observado uma grande presença de peptídeos após a coloração de Coomassie os géis foram submetidos à revelação por prata (Figura 7B e 8B) devido ao fato deste tipo de coloração ser mais sensível que Coomassie. Destacando-se ainda que a revelação de prata é um método 100 vezes mais sensível se comparado à utilização de azul de Coomassie, já que o mesmo consegue detectar nanogramas de proteínas (RABILLOUD, 1990; RABILLOUD, *et al.*, 1994; CANDIANO, *et al.*, 2004). Nas Figuras 7B e 8B após a revelação de Coomassie foi observada uma grande quantidade de peptídeos comprovando a eficácia deste tipo de coloração para análise de frações que encontram-se em pequenas quantidades, principalmente peptídeos. Também, após a coloração de prata na Figura 8B na amostra Q11 observa-se a diminuição da α -CN (*). Após estes resultados uma nova coleta foi realizada conforme verificada nas Figuras 9 e 10 com objetivo de confirmar o perfil proteico do queijo da região de Jaguaribe, bem como da amostra Q11 que se diferenciou das demais. Nas 16 amostras coletadas e submetidas a eletroforeses em presença de SDS inicialmente realizou-se uma coloração de Coomassie (9A e 10A) seguida de uma coloração de prata (9B e 10B) onde observaram-se resultados semelhantes aos dos géis mostrados nas Figuras 7 e 8, com exceção da amostra Q11 onde a α -CN apresentou um perfil semelhante as demais amostras. Sugerindo, portanto, que a diminuição desta proteína (α -CN) da amostra Q11 apresentada na Figura 8 deve ter ocorrido em decorrência de algum problema durante a fabricação ou mesmo relacionado à qualidade do leite ou quantidade de coalho (quimosina) utilizada.

Deve-se ressaltar, que durante a aplicação dos questionários observou-se alguns dos mestres queijeiros com baixa escolaridade e erros relacionados à quantidade de quimosina para fabricação do queijo pode ser relativamente fácil, pois na mesma embalagem, marca e apresentação (líquido ou pó) existem coalhos com poder coagulantes distintos podendo facilmente ser adicionado quantidades diferentes de coalho durante o processamento. Portanto, a diminuição da α -CN na amostra Q11 pode ter sido favorecida pela quimosina. Uma vez que, a ordem de hidrólises das caseínas do leite pela quimosina ocorre preferencialmente na κ -, seguida pela α -CN e β -CN, sendo a β -CN mais resistente que as demais (TRUJILLO, *et al.*, 1997). Esta ordem de hidrólise provavelmente também ocorre no queijo Coalho de Jaguaribe onde observa-se facilmente nas eletroforeses a hidrólise

da κ -CN comprovada pela presença da para- κ -caseína e a degradação da α_s -CN mostrada na amostra Q11. Também em todos os géis observa-se a presença da β -CN sem alterações em decorrências da mesma ser mais resistente a hidrólise.

Ressaltando-se ainda que a α_{s1} -caseína é uma das frações mais susceptíveis à proteólise, conforme foi verificado por diversos autores em uma grande variedade de queijos, a exemplo do Canestrato Pugliese, Fiore Sardo e Pecorino Romano (DI CAGNO, *et al.*, 2003), Taleggio (GOBBETTI, *et al.*, 1997a), Gorgonzola (GOBBETTI, *et al.*, 1997b); Mussarela (FEENEY, *et al.*, 2002), Caciocavallo Pugliese (GOBBETTI, *et al.*, 2002) entre outros. No entanto, a degradação da β -caseína é inferior (DI CAGNO, *et al.*, 2003; KALIT, *et al.*, 2005).

Com intuito de identificar o perfil eletroforético das proteínas do queijo Coalho em presença de ureia, bem como verificar o comportamento da amostra Q11 (α_s -CN) apresentada na Figura 8 realizou-se uma nova eletroforese. Após coloração de Coomassie (Figura 11) verificou-se na amostra Q11 a presença de uma banda com massa aparente inferior mais baixa (*) mostrando, portanto, a degradação da α_s -CN com formação de um peptídeo, confirmando os resultados apresentados na realização das eletroforeses em presença de SDS mostrados na Figura 8.

Figura 9: Caracterização eletroforética (PAGE-SDS) de queijos Coalho produzidos na região de Jaguaribe-CE. Depósito de 40 μL de proteínas ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Revelação com azul de Coomassie (A) e prata (B). PM: Peso molecular padrão. CN: caseinato de sódio bovino; LS: Lactosoro; α_s -CN: α_{s1} - + α_{s2} -caseínas; β -CN: β -caseína; κ -CN: κ -caseína; para- κ -CN: para- κ -caseína; β -LG: β -lactoglobulina; α -LG: α -Lactalbumina; Q1 a Q8: Amostras 1 a 8 dos queijos.

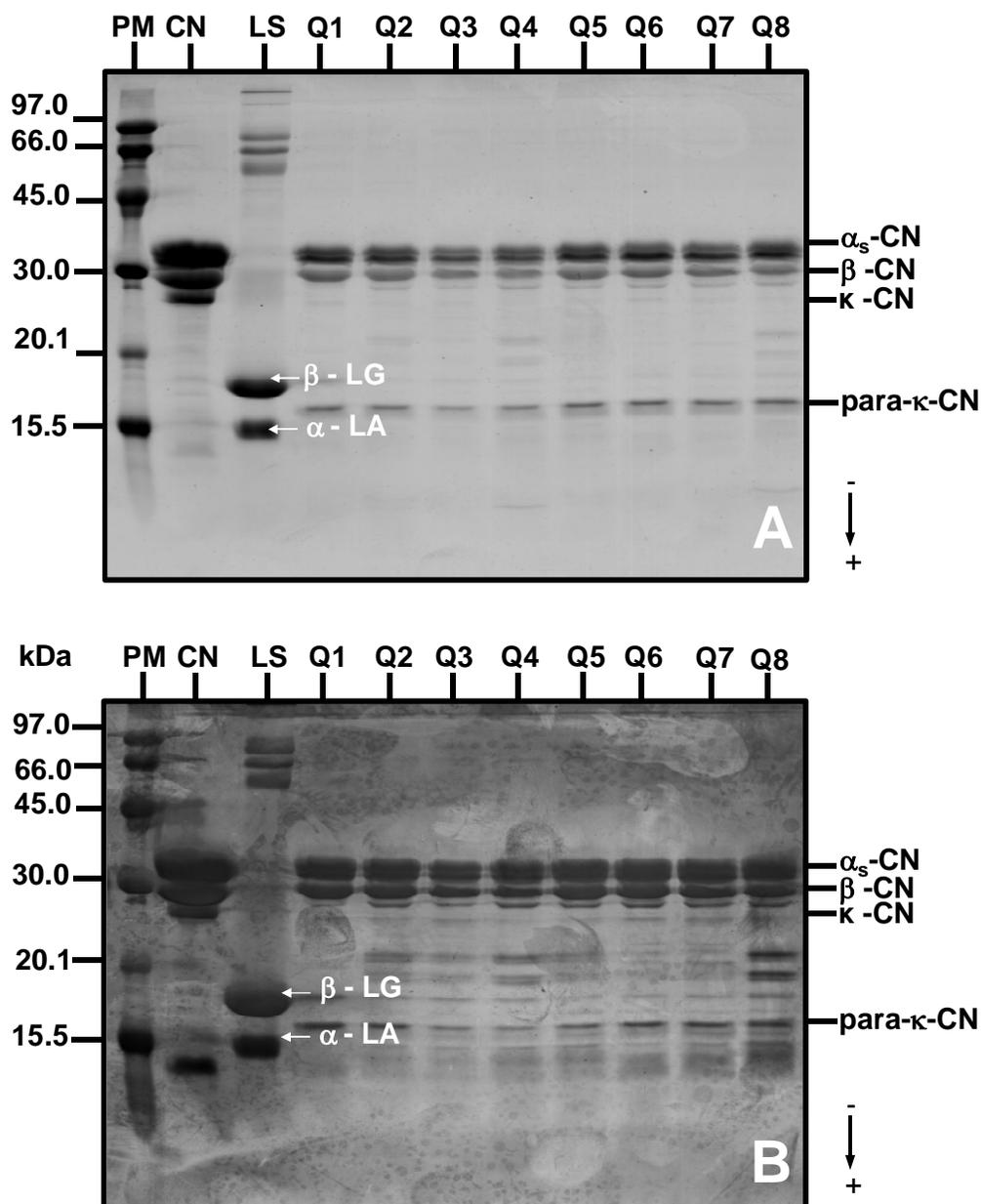


Figura 10: Caracterização eletroforética (PAGE-SDS) de queijos Coalho produzidos na região de Jaguaribe-CE. Depósito de 40 μL de proteínas ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Revelação com azul de Coomassie (A) e prata (B). PM: Peso molecular padrão. CN: caseinato de sódio bovino; LS: Lactosoro; α_s -CN: α_{s1} - + α_{s2} -caseínas; β -CN: β -caseína; κ -CN: κ -caseína; para- κ -CN: para- κ -caseína; β -LG: β -lactoglobulina; α -LG: α -Lactalbumina; Q9 a Q16: Amostras 9 a 16 dos queijos.

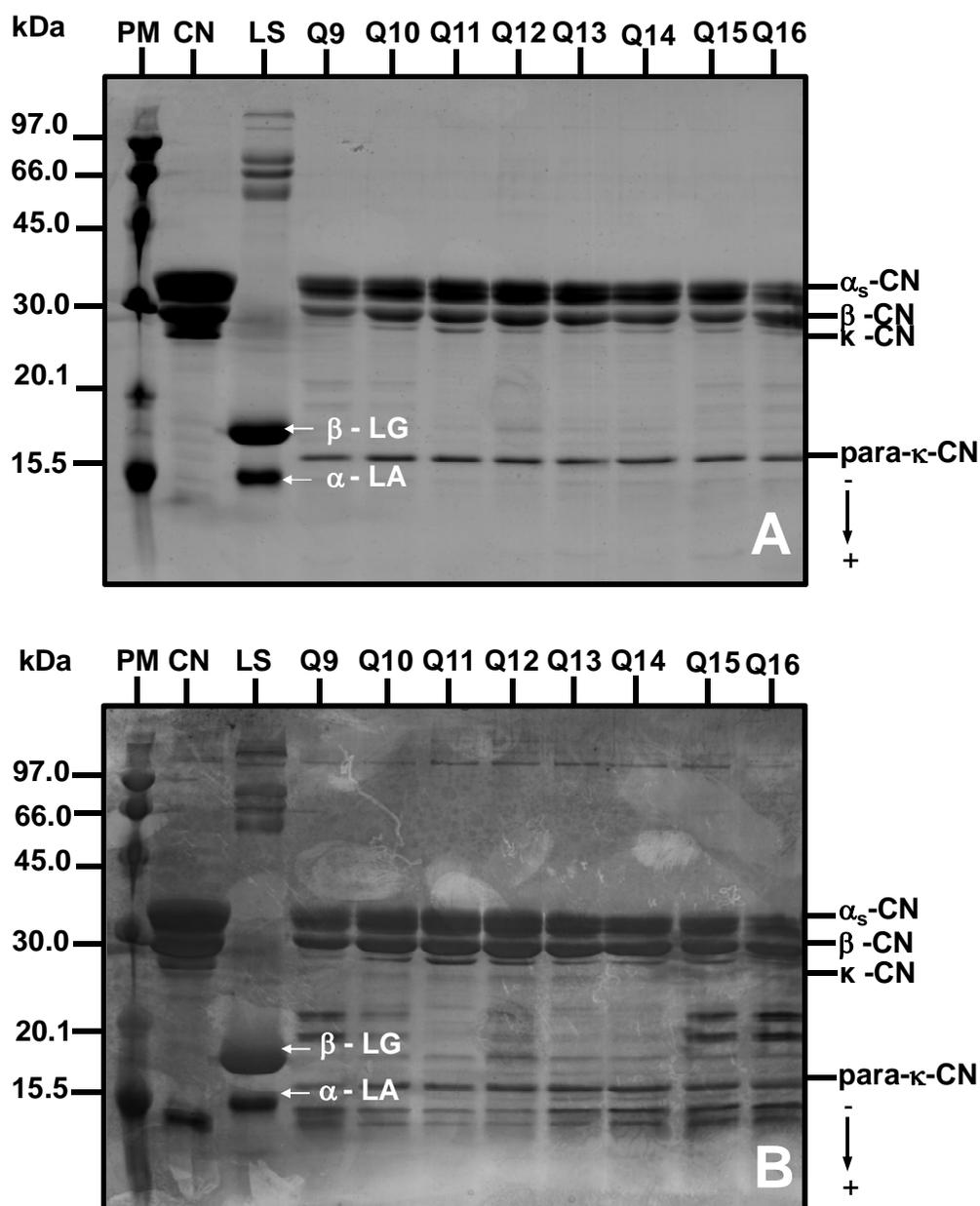
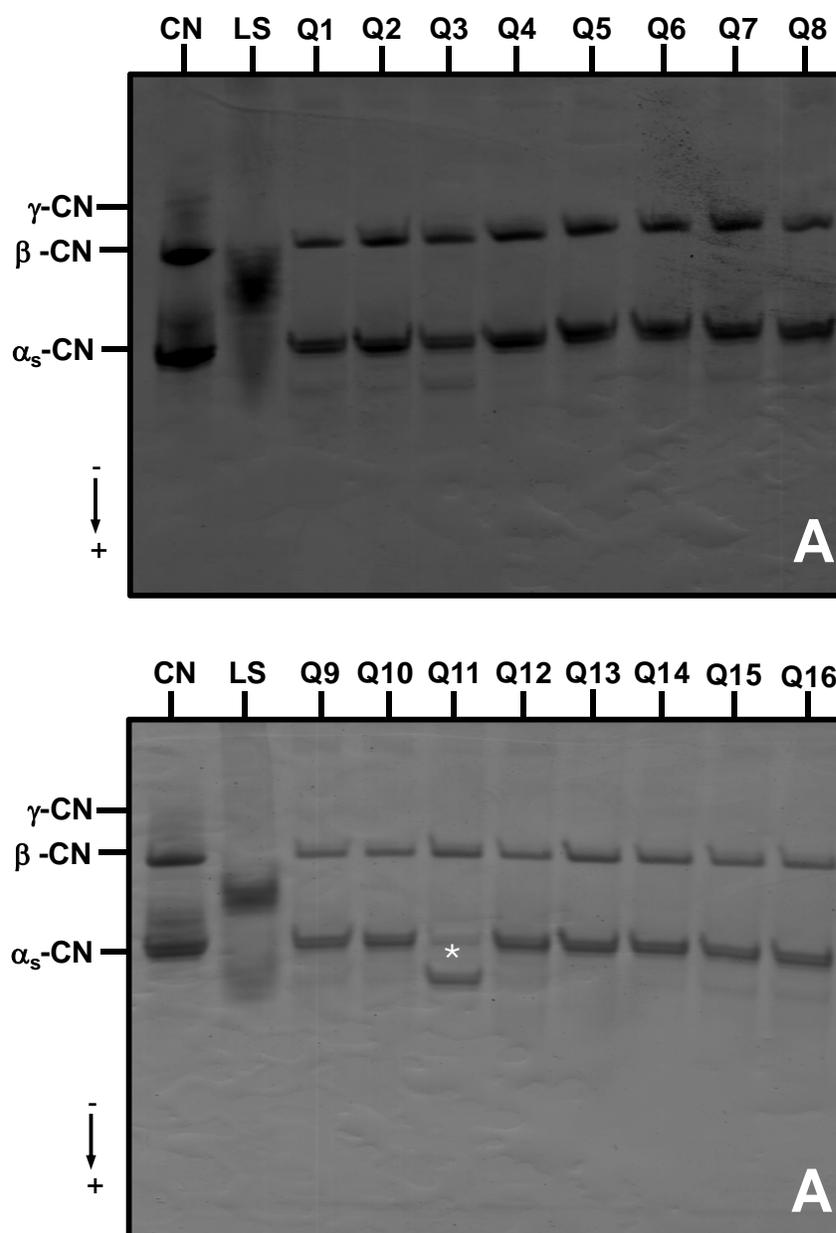


Figura 11: Caracterização eletroforética (PAGE-Uréia) de queijos Coalho produzidos na região de Jaguaribe-CE. Depósito de 40 μL de proteínas ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Revelação com azul de Coomassie (A). CN: caseinato de sódio bovino; LS: Lactosoro; $\alpha\text{-CN}$: $\alpha\text{-caseína}$; $\beta\text{-CN}$: $\beta\text{-caseína}$; $\gamma\text{-CN}$: $\gamma\text{-caseína}$; Q1 a Q16: Amostras 1 a 16 dos queijos. * migração distinta após hidrólise da $\alpha\text{-CN}$.



Após estes resultados novas coletas foram realizadas com 10 produtores selecionados conforme especificada no capítulo 1 com intuito de confirmar o perfil eletroforético característico do queijo produzido na região demarcada. Após a realização de eletroforeses em presença de SDS e submissão a coloração de Coomassie seguido pela coloração de prata observou-se perfil semelhante em todas as amostras (Q1-Q10) conforme mostrado nas Figuras 12 A e 12B. Após realização das eletroforeses em presença de uréia com coloração de Coomassie (Figura 13) foram observadas as duas bandas equivalentes à alfa e beta caseína. Confirmando, portanto o perfil das proteínas do queijo Coalho de Jaguaribe utilizando eletroforeses em presença de SDS e uréia. Nesta fase dos experimentos pode-se observar que tanto em presença de SDS como de uréia é possível identificar possíveis perfis característicos dos queijos de Jaguaribe, podendo esta técnica ser utilizada como possível marcador de “qualidade” do queijo imediatamente após a fabricação, visto que todas as amostras foram coletadas imediatamente após prensagem. No entanto, a eletroforese em presença de uréia mostrou-se mais eficiente para ser utilizada como técnica por possíveis certificadoras uma vez que a proteína utilizada como marcadora (α_s -CN) se destaca mais após separação na presença de uréia que em presença de SDS.

Figura 12: Caracterização eletroforética (PAGE-SDS) de queijos Coalho produzidos na região de Jaguaribe-CE. Depósito de 40 μL de proteínas ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Revelação com azul de Coomassie (A) e Prata (B). PM: Peso molecular padrão. CN: caseinato de sódio bovino; α_s -CN: α_{s1} - + α_{s2} -caseínas; β -CN: β -caseína; κ -CN: κ -caseína; para- κ -CN: para- κ -caseína; Q1 a Q10: Amostras 1 a 10 dos queijos.

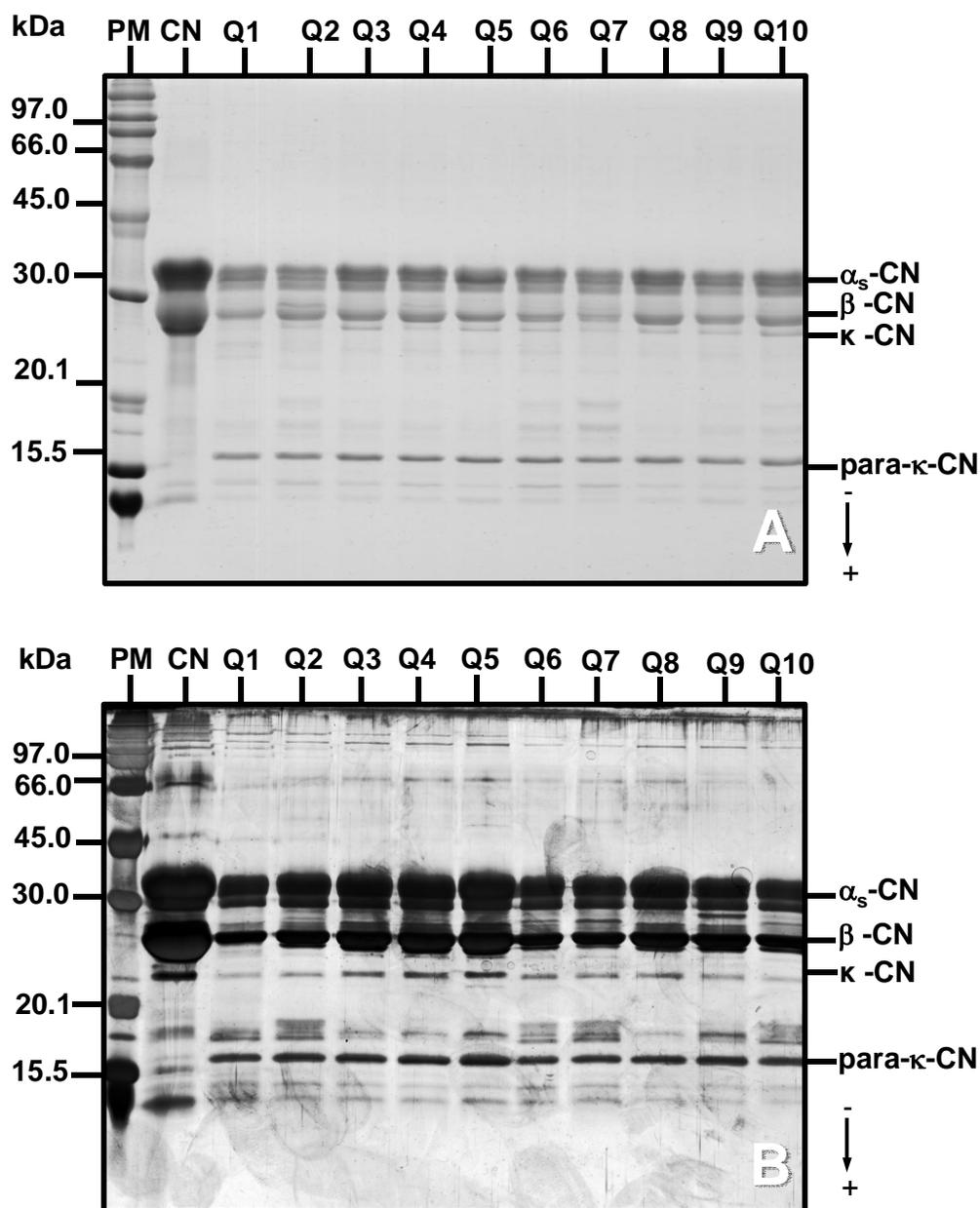
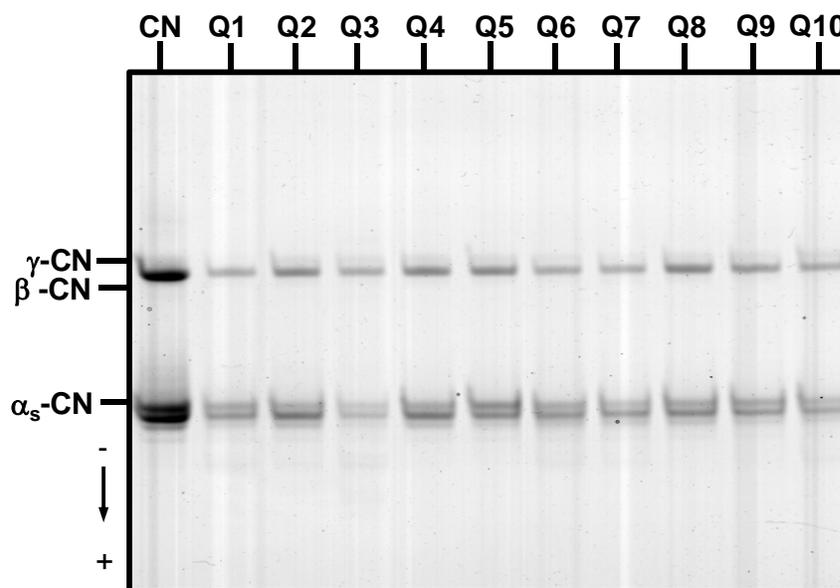


Figura 13: Caracterização eletroforética (PAGE-Uréia) de queijos Coalho produzidos na região de Jaguaribe-CE. Depósito de 40 μL de proteínas (2 mg.mL^{-1}). Revelação com azul de Coomassie. CN: caseinato de sódio bovino; α_s -CN: α_{s1} -caseína; β -CN: β -caseína; γ -caseína: gama-caseína; Q1 a Q10: Amostras 1 a 10 dos queijos.



Estes estudos são bastante inovadores em decorrência da possibilidade de termos uma forma de poder detectar possíveis problemas durante o processamento. Soma-se ao fato da originalidade do estudo uma vez que não foi observado na literatura trabalhos que tenha definido os perfis proteicos do queijo Coalho fabricado de forma artesanal na presença de SDS e uréia, sendo observado apenas um artigo onde os autores (BENEVIDES *et al.*, 2000) mostraram o perfil proteico em presença de SDS elaborados a partir de leite cru e leite pasteurizado inoculado com *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* mantidos sob temperatura ambiente e temperatura de refrigeração.

Após esta fase um novo experimento foi realizado com intuito de comparar os perfis proteicos dos 10 produtores da região demarcada em Jaguaribe-CE com queijos Coalho artesanais produzidos em Pernambuco e Rio Grande do Norte conforme verificado na Figura 14. Após a coloração com prata observou-se que os queijos produzidos no Ceará apresentou uma maior concentração de

peptídeos que os produzidos nas demais regiões. Esta metodologia apresenta potencial como possível diferenciador dos queijos destas regiões. No entanto, em decorrência da pequena quantidade de amostras testadas neste experimento maiores estudos deverão ser realizados com intuito de confirmar esta hipótese.

Em decorrência destes resultados promissores utilizando eletroforeses em presença de SDS e uréia, realizou-se outro experimento com intuito de verificar o perfil proteico do queijo Coalho de Jaguaribe utilizando eletroforese bidimensional. Como primeira dimensão a separação pelo pH e segunda SDS. Esta técnica tem sido aplicada ao leite e queijos com intuito de obter mapas proteicos e peptídeos destes alimentos visando o estudo de diferentes aspectos dos produtos lácteos como identificação de variantes genéticas, modificações pós-tradução e de proteólise das proteínas do leite (MANSO; LEONIL; GAGNAIRE, 2005; O'DONNELL, *et al.*, 2004; PIRAINO, *et al.*, 2007; PISANU, *et al.*, 2012). Na Figura 15 observa-se o perfil dos géis após coloração de Coomassie (Figura 15 A) seguido pela coloração de prata (Figura 15B). Onde observa-se a presença das caseínas α_s - e β -CN e alguns peptídeos após a coloração de Coomassie (Figura 15A) sendo estes peptídeos mais visíveis no momento em que este gel foi submetido a coloração de prata (Figura 15B). Após estes resultados iniciou-se outro experimento baseado nos estudos de Egito *et al.* (2002) utilizando como primeira dimensão eletroforese em presença de uréia e segunda SDS, onde observou-se na Figura 16A a coloração com Coomassie seguida pela coloração de prata 16B. Pode-se observar a presença da α_s - CN e β -CN. No entanto, ao compararmos os géis das Figuras 15 e 16 observou-se que na metodologia tradicional (Figura 15) a separação dos “spots” é mais visível principalmente após coloração de prata (Figura 15B). Apesar da boa separação, novos estudos são necessários com intuito de aprofundar a tecnologia, buscando comparar queijos Coalhos com distintos dias de maturação, de outras regiões ou mesmo realizar a extração de peptídeos solúveis em água e obter os mapas dos mesmos através de identificação por espectrometria de massa com intuito de validar as técnicas para obtenção de possíveis marcadores de IG.

Figura 14: Caracterização eletroforética (PAGE-SDS) de queijos Coalho produzidos no Ceará-CE, Pernambuco-PE e Rio Grande do Norte-RN. Depósito de 40 μL de proteínas (2 mg.mL^{-1}). Revelação com prata. PM: Peso molecular padrão. CN: caseinato de sódio bovino; LS: Lactosoro; α_s -CN: α_{s1} + α_{s2} -caseínas; β -CN: β -caseína; κ -CN: κ -caseína; para- κ -CN: para- κ -caseína; Q1 a Q10: Amostras 1 a 10 dos queijos.

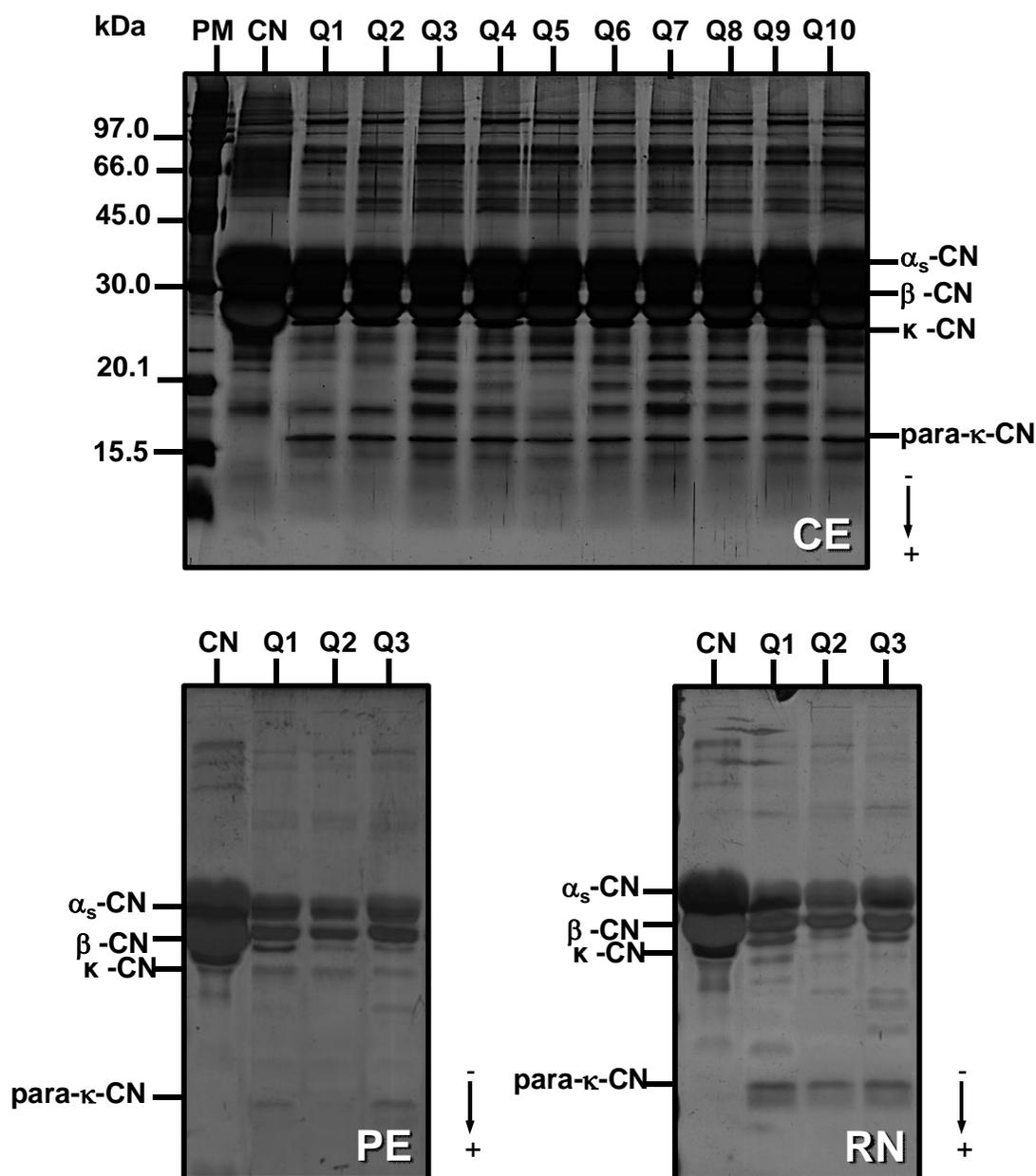


Figura 15: Separação das proteínas do queijo Coalho por PAGE-2D combinando isoeletrofocalização (IEF) / PAGE-SDS. Uma quantidade de 40 μ L de proteínas foi depositada no gel de primeira dimensão (IEF). As proteínas foram reveladas com azul de Coomassie (A) seguida por coloração de prata (B). Q: Amostra de queijo, α -CN: Alfa caseína, β -CN: Beta caseína.

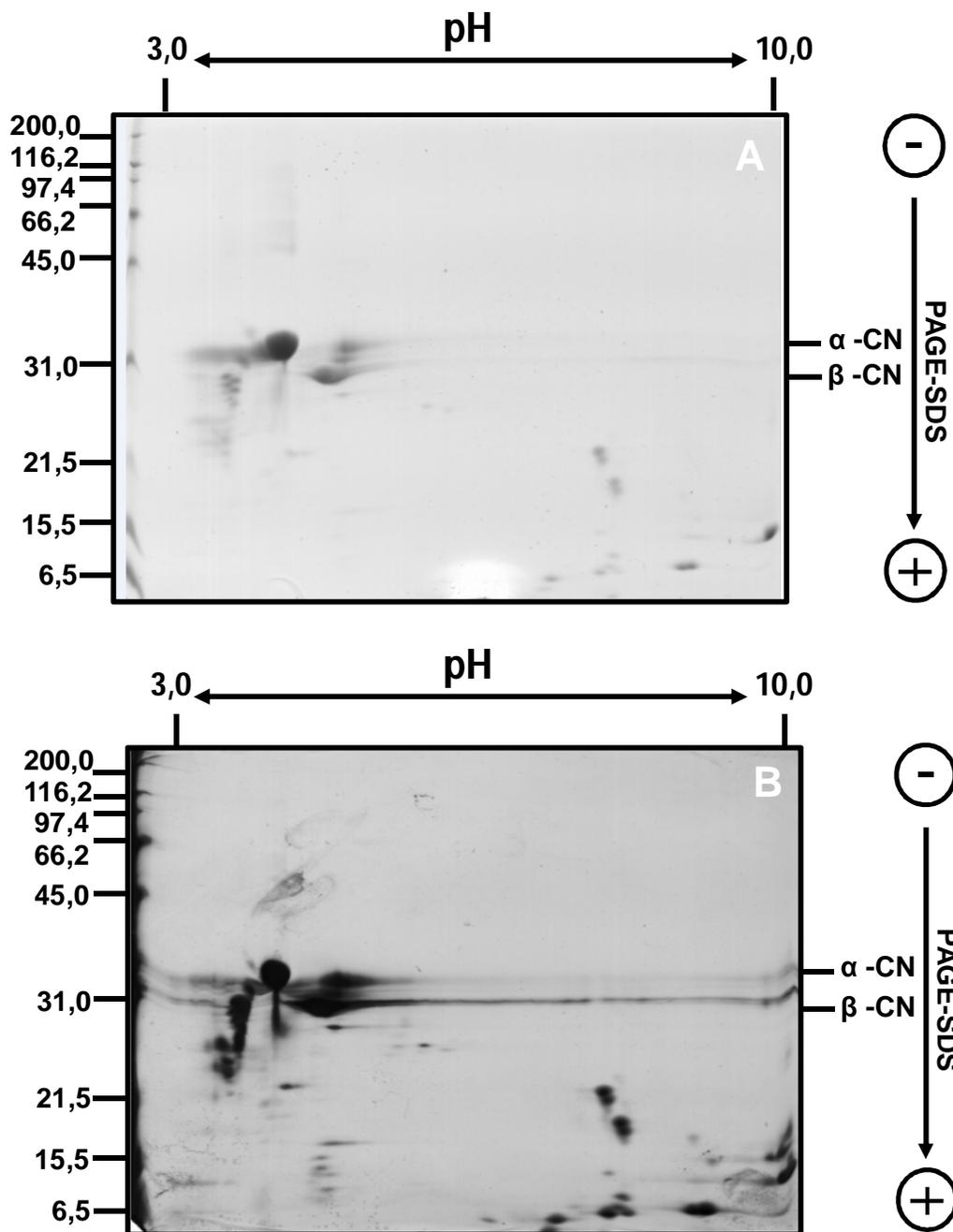
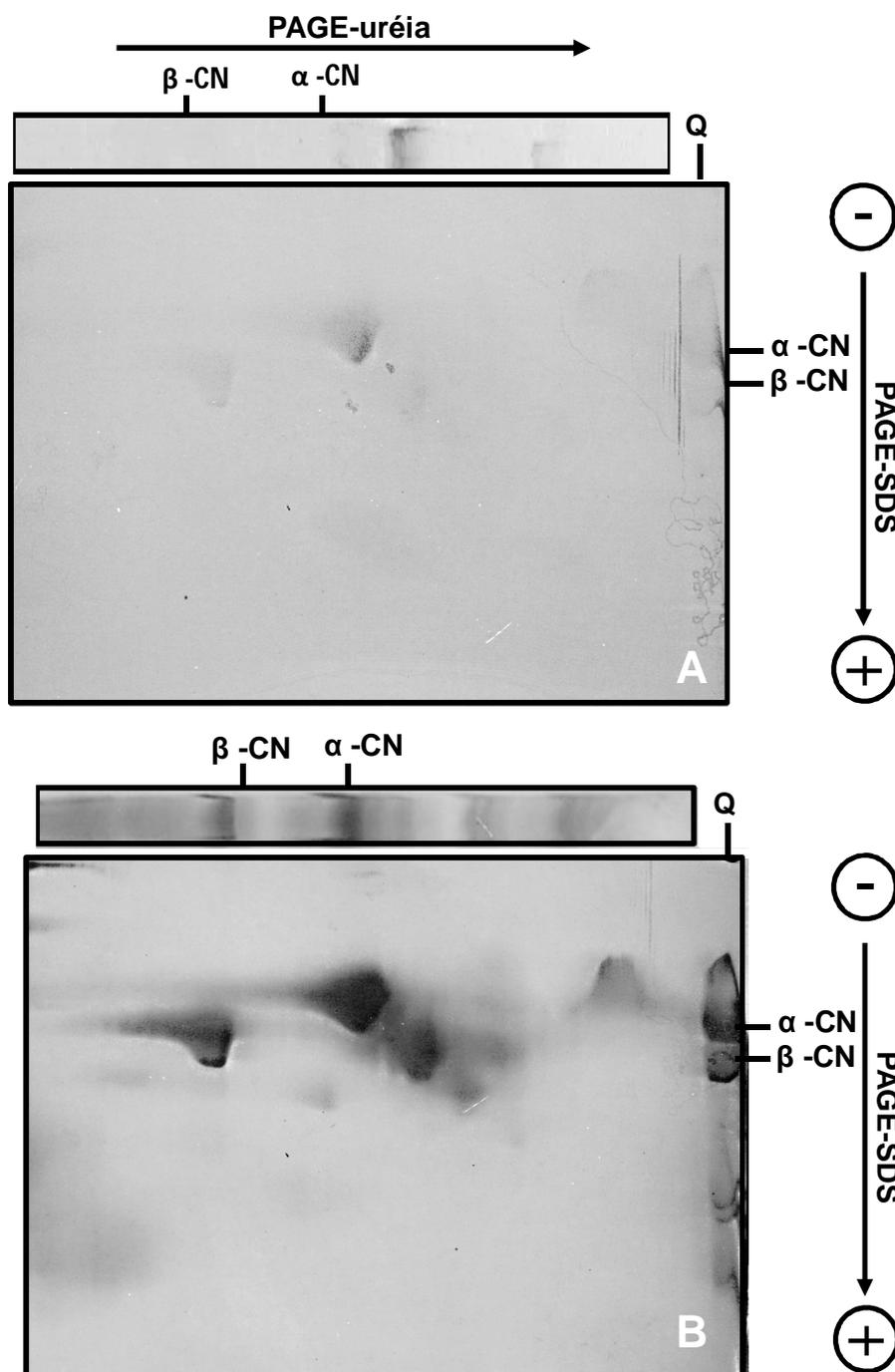


Figura 16: Separação das proteínas do queijo Coalho por PAGE-2D combinando PAGE-uréia / PAGE-SDS. Uma quantidade de 80 μ L de proteínas foi depositada no gel de primeira dimensão (PAGE-uréia). As proteínas foram reveladas com azul de Coomassie (A) seguida por coloração de prata (B). Q: Amostra de queijo, α -CN: Alfa caseína, β -CN: Beta caseína.



5.3- *CAPITULO 3*

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
PEPTÍDEOS PROVENIENTES DO QUEIJO
COALHO DE JAGUARIBE- CE UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA E ESPECTROMETRIA DE MASSA.**

5.3 CAPÍTULO 3. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS PROVENIENTES DO QUEIJO COALHO DE JAGUARIBE-CE UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E ESPECTROMETRIA DE MASSA

Nos últimos anos a utilização de técnicas bioquímicas e proteômicas tem permitido uma nova abordagem para caracterizar a origem e evolução de produtos alimentares. Entre estas técnicas destacam-se a Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) somada à espectrometria de massa.

Isolamento de peptídeos e proteínas do leite por cromatografia de fase reversa realizado por Voirin *et al.* (1991) foi um dos primeiros estudos de impressão digital peptídica em alimentos. Egito *et al.* (2001, 2007) utilizaram cromatografia de fase reversa combinada com espectrometria de massa para avaliar os produtos de hidrólise da caseína no leite da espécie equina. Essa abordagem também foi utilizada em diversos estudos para a caracterização dos diferentes tipos de queijo, tais Ragusano (GAGNAIRE, *et al.*, 2011), Cheddar (ALLI, *et al.*, 1998), Emmental (GAGNAIRE, *et al.*, 2001), Grana Padano (SFORZA, *et al.*, 2003), e Manchego (GOMEZ-RUIZ, *et al.*, 2004, 2006).

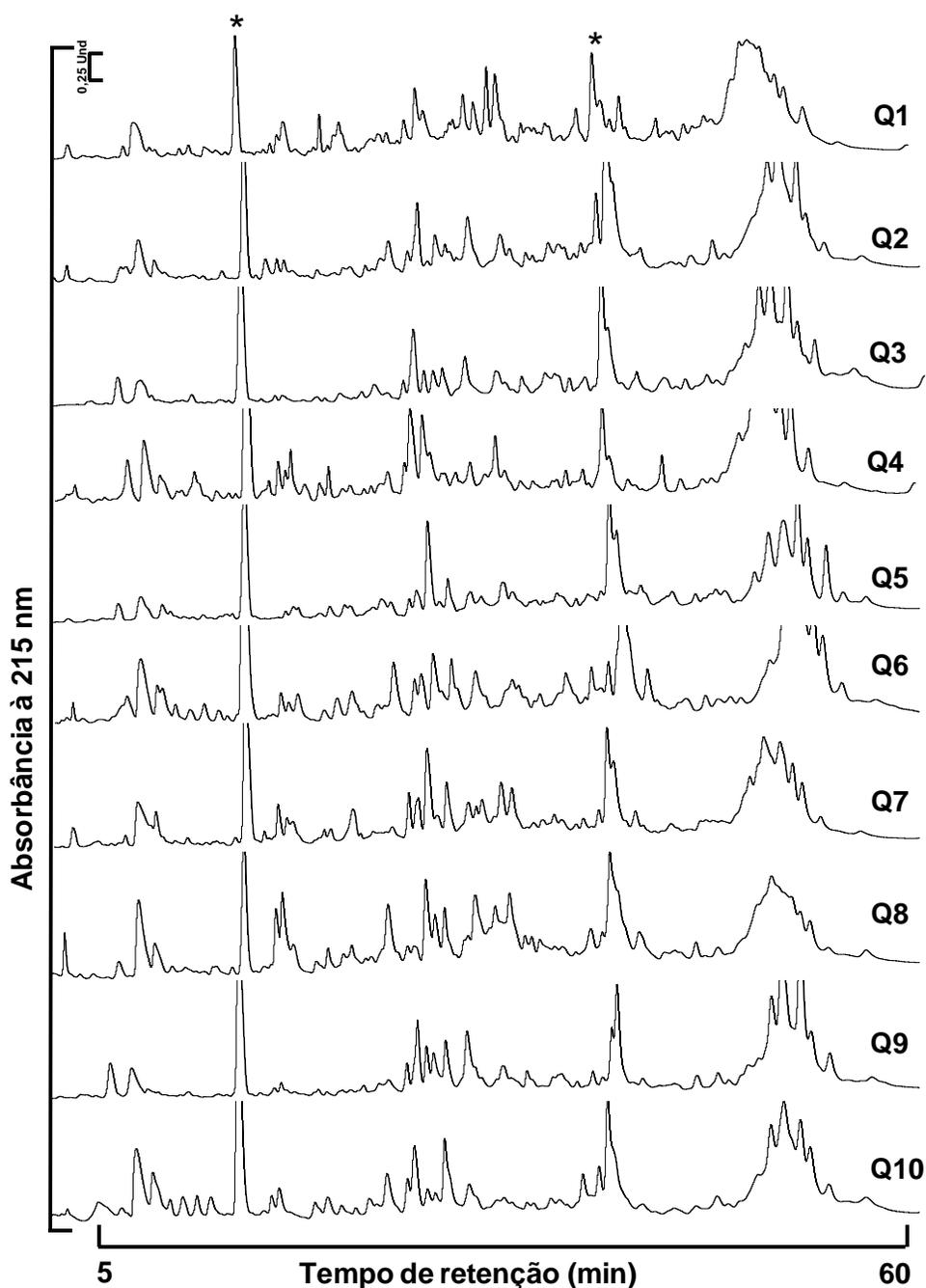
Em decorrência da grande aplicação destas técnicas nos estudos de leite e derivados realizou-se a caracterização e identificação dos peptídeos solúveis em água dos queijos Coalhos da região de Jaguaribe. Para realização dos estudos foram cumpridas três etapas, destacando-se: a caracterização dos perfis cromatográficos por HPLC do queijo Coalho, seguida da separação por HPLC dos peptídeos solúveis em água e finalmente a identificação dos peptídeos purificados por HPLC utilizando espectrometria de massa.

5.3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS DOS PEPTÍDEOS DE QUEIJO COALHO DE JAGUARIBE-CE

Após a caracterização eletroforética dos queijos coletados nas 10 queijarias selecionadas da região demarcada e observação de uma gama de peptídeos após revelação de prata conforme mostrado no capítulo 2, realizou-se a extração destes peptídeos solúveis em água e submissão do extrato liofilizado a separação por HPLC. Conforme mostrado na Figura 17 pode-se observar um perfil similar em todas as amostras analisadas com aparecimento de duas frações características com tempo de retenção de 16.989 e 39.907 minutos. Esses resultados são de grande importância, pois podemos verificar que os queijos produzidos na região de Jaguaribe após o primeiro dia de fabricação apresentam perfis cromatográficos semelhantes. Portanto, o fato destes queijos possuírem características peptídicas semelhantes é mais um fator para favorecer o processo de IG, haja visto que, Os queijos nos primeiros dias de fabricação apresentam perfis bastante semelhantes, mesmo produzidos em queijarias distintas.

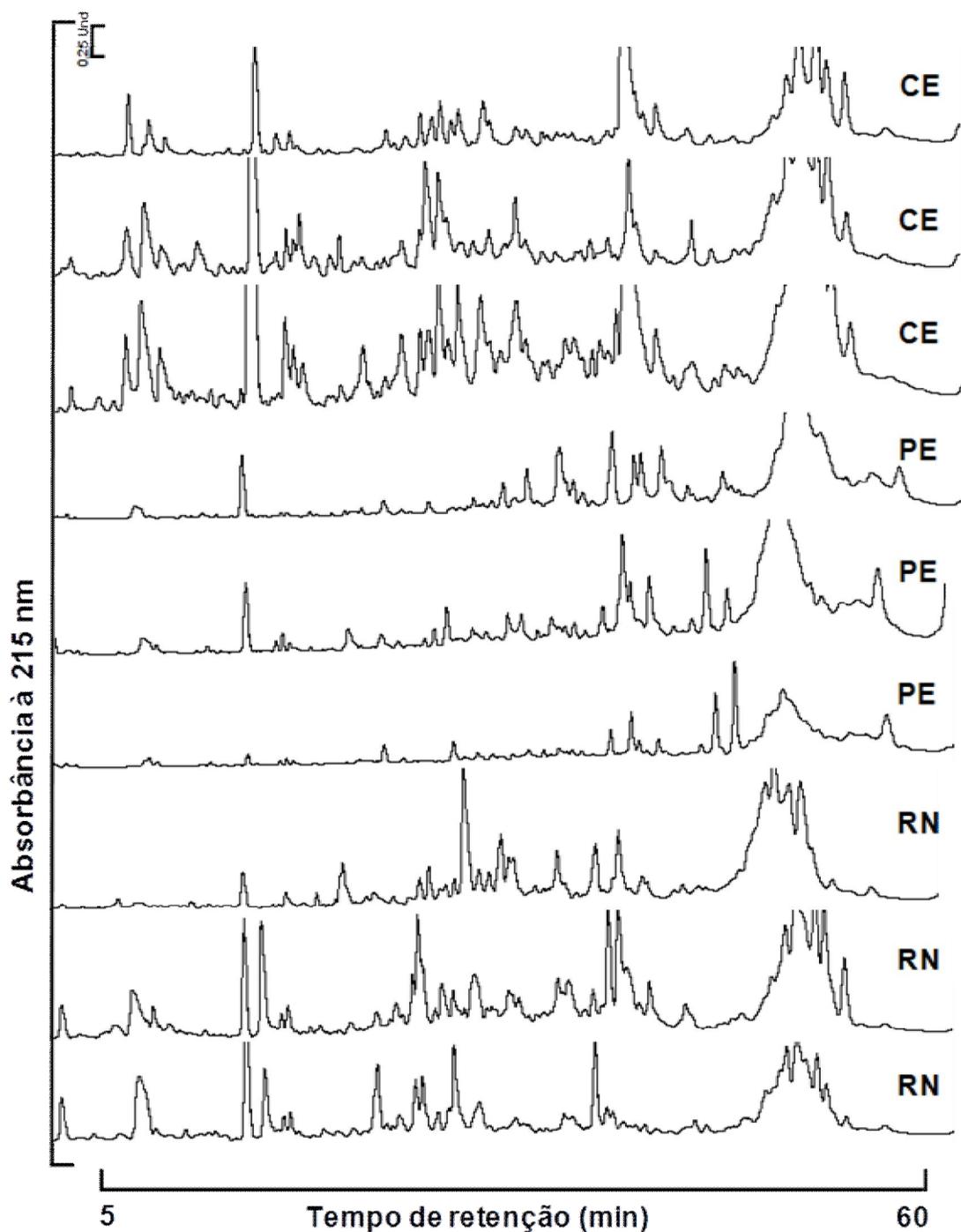
Apesar destes resultados animadores, estudos mais detalhados devem ser realizados com intuito de verificar o comportamento dos peptídeos destes queijos em diferentes períodos de produção como estação seca e chuvosa onde em decorrência da mudança de clima e alimentação bem como mudança da microbiota presente no leite poderá ocasionar a formação de distintos peptídeos, modificando estes perfis cromatográficos, já que no Nordeste estas duas estações são bem acentuadas, causando mudanças bruscas, principalmente na estação seca, onde ocorre principalmente modificações na qualidade da forragem ofertada aos animais. Além destes estudos se faz necessário a caracterização durante o período de estocagem com intuito de verificar se não ocorrem proteólises importantes que possam diferenciar o produto. Em decorrência do queijo Coalho produzido na região de Jaguaribe ser um produto de rápido consumo provavelmente a proteólise não será tão intensa como a verificada em queijos maturados não tendo tanta influência sob os perfis peptídicos como nos estudos com queijos do tipo Emental (GAGNAIRE, *et al.*, 2001), Port Salut Argentino (VERDINI, *et al.*, 2004) e manchego (POVEDA, *et al.*, 2003).

Figura 17: Cromatogramas (RP-HPLC) de peptídeos de queijo Coalho produzidos na região de Jaguaribe/CE. Volumes de 100 μ L contendo 4mg de peptídeos foram injetados em coluna C18 com gradiente linear 5 a 50% (v/v) de acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético durante 60 min com fluxo de 1 mL/min. *: frações com tempo de retenção de 16.989 e 39.907 minutos. Q1 a Q10: Amostras 1 a 10 dos queijos.



Após estes experimentos amostras provenientes da região demarcada neste estudo foram comparadas com amostras coletadas em Pernambuco e Rio Grande do Norte. Foi possível observar (Figura 18) que o perfil dos queijos coletados em Jaguaribe Ceará é distinto do observado em Pernambuco, apresentando semelhança com o do Rio Grande do Norte. Sendo este experimento interessante visto que através de cromatografia poderá se diferenciar os queijos de Jaguaribe dos provenientes do agreste de Pernambucano, região com potencial para solicitação de IG. Quanto à semelhança com os queijos do Rio Grande do Norte este fato pode ser explicado por tratar-se de Estados vizinhos onde o clima, alimentação e raça animal são bem mais próximas que os observados no Agreste de Pernambuco. Somados ao fato, a tecnologia de fabricação utilizada pelos mestres queijeiros da Região de Jaguaribe-CE e Região do Seridó-RN são mais próximas que as da Região do agreste Pernambucano, principalmente pelo aquecimento da massa no CE e RN fato não observado no processo tecnológico do Agreste pernambucano. Apesar dos resultados promissores para que esta técnica seja utilizada por possíveis “certificadoras” para distinguir o queijo Coalho de Jaguaribe dos queijos de Coalho produzidos no Agreste de Pernambuco. Além desta possibilidade, a cromatografia poderá ser utilizada no monitoramento do processamento de produção dos queijos, onde o aparecimento ou desaparecimento de peptídeos poderá permitir um diagnóstico de possíveis problemas de processamento do queijo ou mesmo da qualidade do leite utilizado. No entanto, maiores estudos para validação da técnica devem ser realizados levando-se em consideração os fatores que afetam a proteólise dos queijos ocasionando a formação dos peptídeos conforme discutido anteriormente.

Figura 18: Caracterização cromatográfica (RP-HPLC) do queijo Coalho do Ceará, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Volumes de 100 μ L contendo 4mg de peptídeos foram injetados em coluna C18 com gradiente linear 5 a 50% (v/v) de acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético durante 60 min com fluxo de 1 mL/min.



5.3.2 SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC) DOS PEPTÍDEOS SOLÚVEIS EM ÁGUA PROVENIENTES DO QUEIJO COALHO DE JAGUARIBE-CE

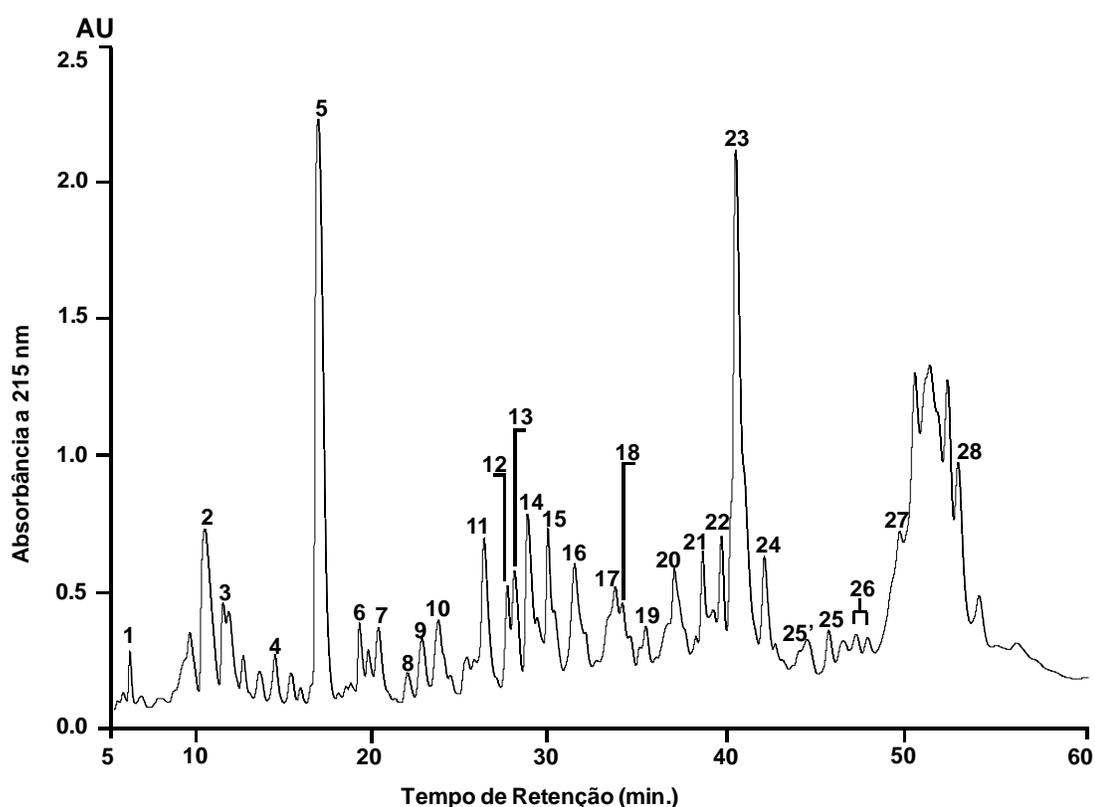
Os principais componentes de extratos aquosos de queijo são, provavelmente, os peptídeos derivados a partir da hidrólise enzimática das caseínas (GAGNAIRE, *et al.*, 2001 e 2011; SILVA & MALCATA, 2005; PIRAINO, *et al.*, 2007). O tipo e a quantidade dos péptideos gerados nos queijos podem variar dependendo das enzimas adicionadas para coagulação do leite ou produzidas pelos microorganismos provenientes do leite cru ou adicionados através da adição dos fermentos lácteos que influenciam a atividade enzimática que por sua vez, pode ser influenciada por parâmetros como a atividade de água. Assim, a análise destes péptideos por cromatografia e espectrometria de massa é um passo necessário para a atribuição de características específicas para o queijo artesanal. A Figura 19 mostra o perfil de peptídeo de um conjunto de extratos aquosos do queijo Coalho da região jaguaribana analisados por RP-HPLC, com posterior identificação dos picos sequenciados em MALDI-TOF-MS.

As condições cromatográficas utilizadas permitiram boa resolução dos picos referentes aos peptídeos, o que facilitou a identificação e quantificação segura da sequência de aminoácidos dos peptídeos presentes na amostra. Vinte e oito frações distintas foram coletadas quando apresentaram absorvância superior a 0,2 AU e dois componentes principais são claros no cromatograma. A fração 5, com tempo de retenção de 16.989 minutos correspondente aos peptídeos (29-39), (29-40), (30-42), (30-43) originados da β -caseína e os peptídeos (80-90) e (110-119) originados da α_{s1} -caseína, a outra é a fração 23, com tempo de retenção de 39.907 minutos que apresentaram os segmento (108-119), (109-119), (162-190) da β -caseína, seguimento (163-190) da β_{A2} -caseína, e os segmentos (1-23), (14-23), (24-37), (24-38) e (24-39) da α_{s1} -caseína. O sequenciamento detalhado dos péptideos por espectrometria de massa será discutido a seguir.

Este estudo abre uma nova perspectiva para análise do queijo Coalho, pois as sucessivas separações cromatográficas obtidas anteriormente na figura 17 mostram a repetitividade da metodologia, além do fato de que a separação de

peptídeo por cromatografia de fase reversa também tem sido investigada para fornecer uma “impressão digital peptídica” de outros tipos de queijo, tais como Feta, Emental e Ragusano (MICHAELIDOU, *et al.*, 1998; SIEBER, *et al.*, 2010; GAGNAIRE, *et al.*, 2011.). Sendo, portanto, a técnica uma possibilidade de observar se peptídeos identificados em queijos europeus, por exemplo, com atividade biológica estão presente também no queijo Coalho nordestino, uma vez que este queijo pertence ao mesmo grupo tecnológico dos estudados, ou seja, são realizados através de coagulação enzimática, utilizando quimosina como agente coagulante.

Figura 19. Cromatograma (RP-HPLC) de peptídeos de queijo Coalho provenientes da região de Jaguaribe-CE. Volumes de 100 μ L contendo 4mg de peptídeos foram injetados em coluna C18 com gradiente linear 5 a 50% (v/v) de acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético durante 60 min com fluxo de 1 mL/min. 1 a 28: Numeração referente aos picos sequenciados nas Tabelas 3 e 4.



5.3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS PURIFICADOS POR HPLC UTILIZANDO ESPECTROMETRIA DE MASSA

As Tabelas 3 e 4 listam as sequências obtidas por MALDI-TOF MS / MS para peptídeos de diferentes frações cromatográficas do queijo Coalho artesanal de Jaguaribe-CE. Os peptídeos estão listados do menos hidrofóbico para as moléculas mais hidrofóbicas. Um total de 109 diferentes péptideos que apresentam massas moleculares entre 703,3 Da a 3237,0 Da foram identificados através do sequenciamento. Peptídeos com cadeias mais curtas são provavelmente encontradas nas frações hidrofílicas mais elevadas, no entanto, eles não foram identificados, devido a interferências da matriz ou a fragmentação ineficiente. Dos péptideos sequenciados, 71 foram segmentos da β -caseína, quatro β_{A2} -caseína, quatro de β_{A3} -caseína (Tabela 3), 21 obtidos a partir da α_{S1} -caseína, cinco da α_{S2} -caseína, e outros quatro foram obtidos de κ -caseína (Tabela 4). Pode-se observar a presença de 18 fosfopeptídeos (Tabelas 3 e 4), onde 17 foram originados a partir de β -caseína e um da α_{S1} -caseína.

Nos últimos anos a espectrometria de massa vem sendo empregada para fornecer “impressões digitais de peptídeos” em diferentes variedades de queijos (ALLI, *et al.*, 1998; COZZOLINO, *et al.*, 2001, 2002; PIRAINO, *et al.*, 2007; PAPPA, *et al.*, 2008; GAGNAIRE, *et al.*, 2011). Especificamente sobre a variedade de queijo Coalho, não existem estudos de caracterização dos principais componentes de peptídeos para fornecer uma impressão digital destes queijos. No estudo das atividades antioxidantes e antimicrobiana dos peptídeos do queijo Coalho de Pernambuco realizados por Silva *et al.* (2012), apenas doze peptídeos idênticos foram encontrados no queijo Coalho de Jaguaribe, onde oito foram originados da β -caseína e 4 da α_{S1} -caseína, estando estes peptídeos presentes na fração 7 através dos segmentos (145-154) originados da β -caseína e (1-13) da α_{S1} -caseína na fração 11 os seguimentos (176-188) da β -caseína e (33-51) da β_{A3} -caseína, na fração 15 o seguimento (14-22) da α_{S1} -caseína, na fração 17 os segmentos (60-72), (98-124) e (170-189) originados da β -caseína, na fração 23 os segmentos (14-23), (24-38) da α_{S1} -caseína, (163-190) da β_{A2} -caseína e na fração 26 o segmento (193-209) da β -caseína. Dos dois componentes principais descritos na seção anterior, os três peptídeos encontrados na fração 23 (segmento 163-190 da β_{A2} -caseína, o segmento

14-23 e o segmento 24-38 de α_{s1} -caseína) também estão presentes no queijo Coalho de Pernambuco (SILVA, *et al.*, 2012). Por outro lado, os peptídeos presentes na fração cromatográfica 5 não foram relatados no estudo do queijo fabricado em Pernambuco. Sendo esta variação do perfil peptídico observada na fração 5 que se destaca nos queijos de Jaguaribe, somadas as demais frações que não foram identificadas no estudo de Silva *et al.* (2012) nos queijos de Pernambuco indicadas como possíveis marcadores molecular para determinar a origem geográfica destes queijos.

Peptídeos derivados de β -Caseína

Fragmentação de fosfopéptídeos podem ser identificados por espectrometria de massa utilizando MALDI pelo favorecimento da perda de neutro de H_3PO_4 com 98 unidades de massa (PALUMBO, *et al.*, 2011). Foram encontrados os seguintes peptídeos fosforilados derivados de β -caseína: segmentos (29-39), (32-39), (29-40), (32-40), (30-42), (32-42), (33-42), (30-43), (32-43), (29-46), (30-46), (29-47), (26-51), (29-51), (32-51), (33-51), (33-57). No entanto, não foi observada qualquer evidência de deslocamento do grupo fosfato que podem ocorrer na fragmentação de peptídeos fosforilados em espectrometria de massa (PALUMBO, *et al.*, 2011). Um fosfopeptídeo correspondente ao segmento (29-46) a partir de β -caseína foi também encontrado na variedade de queijo Beaufort (DUPAS, *et al.*, 2009; LUND & ARDO, 2004). Segmento (33-51) de β_{A3} -caseína identificado nesse estudo também foi relatado por Silva *et al.* (2012) em queijo Coalho artesanal do Estado de Pernambuco. Inúmeros fosfopéptídeos foram também observados em outras variedades de queijo, tais como o queijo Ragusano (GAGNAIRE, *et al.*, 2011). Do ponto de vista nutricional, fosfopéptídeos são importantes uma vez que podem complexar com íons metálicos tais como Fe (II), Ca (II) e Zn (II) e facilitar o transporte desses íons metálicos (SILVA & MALCATA, 2005). No caso do Fe (II), existem indicações de que a formação do complexo também pode impedir a oxidação de Fe (III). A ausência de fosforilação que ocorre na parte N-terminal de peptídeos da β -caseína pode ter sido originada pelo tratamento térmico ($\pm 65^\circ C$) sofrido no processamento do queijo Coalho durante a fabricação. A presença do segmento de péptídeo não fosforilado (29-51), juntamente com o seu homólogo

fosforilado (Tabela 3) e de outro péptideo em que um resíduo de fosforo foi convertido em deidroalanina (sequência: FQ(DhA) EEQQQTEDELQDKIHP, onde DhA é um resíduo de deidroalanina com massa molecular observada de 2311.1 e massa molecular calculada de 2311.0) pode ser também uma desfosforilação parcial que ocorreu durante o processamento do queijo Coalho. No entanto, os segmentos de péptídeos da região N-terminal (vinte e sete primeiros resíduos) da β -caseína não foram encontrados neste estudo, nem fosforilado nem como moléculas não fosforiladas.

Dos 109 péptídeos presentes no queijo Coalho de Jaguaribe, trinta também foram encontrados no estudo peptídico do queijo Ragusano (GAGNAIRE, *et al.*, 2011), 21 dos quais foram derivados de β -caseína e os outros nove eram segmentos de α -caseína que serão discutidos abaixo. Esta particularidade pode estar relacionada com algumas técnicas semelhantes, utilizadas na fabricação das variedades de queijo Coalho e Ragusano, como o tratamento térmico da massa e utilização de quimosina como peptidase para hidrolisar as caseínas.

O péptideo não fosforilado da β -CN (193-209) encontrado neste estudo também foi observado no queijo Coalho de Pernambuco (SILVA, *et al.*, 2012) e no queijo Ragusano durante toda a maturação (GAGNAIRE, *et al.*, 2011). Este péptideo também foi identificado por Sforza *et al.* (2003) em queijo Grana Padano e por Pappa *et al.* (2008) com queijo Teleme. Outros estudos também relataram as várias bioatividades deste péptideo, tais como propriedades imunomoduladoras, antimicrobiana e anti-hipertensiva (SANDRE, *et al.*, 2001; KORHONEN; PIHLANTO, 2006; SILVA; MALCATA, 2005; ONG; SHAH, 2008). Este péptideo é amplamente encontrado em diferentes variedades de queijo, independentemente da tecnologia usada, devido ao grande número de peptidases presentes nos queijos tais como a quimosina, a catepsina D e de enzimas liberadas a partir de bactérias lácteas capaz de hidrolisar a ligação Leu₁₉₂-Phe₁₉₃ do péptideo (GAGNAIRE, *et al.*, 2011). Outros péptídeos que permaneceram até o fim da maturação no queijo Ragusano (GAGNAIRE, *et al.*, 2011), β -CN (193/194-206), também foram encontrados neste estudo. O segmento (145-154) a partir da β -caseína encontrada neste estudo foi referido por Tellez *et al.* (2010), como imunomodulador.

Tabela 3: Peptídeos Identificados de β -caseína a partir do extrato aquoso de queijo Coalho da região de Jaguaribe-CE.

Número do Pico ^a	Massa Molecular (Da)		Fragmento Proteína	Sequência Peptídeo	
	obsd	calcd			
2	1103.5	1103.6	β -CN (32-39)	KFQS(PHOSPHO)EEQQ	
	1333.5	1333.5	β -CN (33-42)	FQS(PHOSPHO)EEQQQTE	
3	1231.6	1231.5	β -CN (32-40)	KFQS(PHOSPHO)EEQQQ	
4	1462.0	1461.8	β -CN (32-42)	KFQS(PHOSPHO)EEQQQTE	
	1577.1	1577.0	β -CN (32-43)	KFQS(PHOSPHO)EEQQQTED	
5	1473.8	1473.7	β -CN (29-39)	KIEKFQS(PHOSPHO)EEQQ	
	1601.9	1602.0	β -CN (29-40)	KIEKFQS(PHOSPHO)EEQQQ	
	1703.7	1703.7	β -CN (30-42)	IEKFQS(PHOSPHO)EEQQQTE	
	1818.8	1818.7	β_{A3} -CN (30-43)	IEKFQS(PHOSPHO)EEQQQTED	
7	1151.6	1151.6	β -CN (145-154)	HQPHQPLPPT	
8	1147.3	1147.6	β -CN (26-34)	INKKIEKFQ	
	1282.7	1282.6	β -CN (144-154)	MHQPHQPLPPT	
9	979.5	979.5	β -CN (44-51)	ELQDKIHP	
	1184.2	1184.6	β -CN(47-56)	DKIHPFAQTQ	
10	1271.8	1271.6	β -CN (47-57)	DKIHPFAQTQS	
	2317.2	2317.0	β -CN (29-46)	KIEKFQS(PHOSPHO)EEQQQTEDELQ	
	2432.2	2432.0	β_{A3} -CN (29-47)	KIEKFQS(PHOSPHO)EEQQQTEDELQD	
	2189.1	2189.0	β -CN (30-46)	IEKFQS(PHOSPHO)EEQQQTEDELQ	
11	1542.9	1542.8	β -CN (176-188)	KAVYPQRDMPIQ	
12	1613.9	1614.0	β -CN (176-189)	KAVYPQRDMPIQA	
	1414.8	1414.7	β -CN (177-188)	AVYPQRDMPIQ	
	1485.9	1485.7	β -CN (177-189)	AVYPQRDMPIQA	
13	1157.7	1157.6	β -CN (193-202)	YQEPVLPVVR	
14	2907.6	2907.5	β -CN (29-51)	KIEKFQS(PHOSPHO)EEQQQTEDELQDKIHP	
	2826.8	2826.5	β -CN (29-51)	KIEKFQSEEQQTEDELQDKIHP	
	2537.3	2537.2	β_{A3} -CN (32-51)	KFQS(PHOSPHO)EEQQQTEDELQDKIHP	
	2311.1	2311.0	β -CN (33-51)	FQ(DhA)EEQQQTEDELQDKIHP	
	2409.2	2409.0	β_{A3} -CN (33-51)	FQS(PHOSPHO)EEQQQTEDELQDKIHP	
	2914.8	2914.5	β -CN (95-119)	VSKVKEAMAPKHKEMPFKYPVEPF	
	1797.1	1796.9	β -CN (140-154)	LQSWMHQPHQPLPPT	
	3262.9	3262.8	β -CN (26-51)	INKKIEKFQS(PHOSPHO)EEQQQTEDELQDKIHP	
16	3071.6	3071.5	β -CN (33-57)	FQS(PHOSPHO)EEQQQTEDELQDKIHPFAQTQS	
	1126.7	1126.6	β -CN (44-52)	ELQDKIHPF	
	2677.7	2677.4	β -CN (166-189)	SQSKVLPVPQKAVYPQRDMPIQA	
	1466.8	1466.7	β -CN (60-72)	YPPFGPIHNSLPQ	
	2877.7	2877.5	β -CN (164-189)	SLSQSKVLPVPQKAVYPQRDMPIQA	
	2247.4	2247.1	β -CN (170-189)	VLPVPQKAVYPQRDMPIQA	
	18	3447.0	3446.4	β -CN (95-124)	VSKVKEAMAPKHKEMPFKYPVEPFESQS
		3260.9	3260.8	β -CN (97-124)	KVKEAMAPKHKEMPFKYPVEPFESQS
3132.8		3132.6	β -CN (98-124)	VKEAMAPKHKEMPFKYPVEPFESQS	
2705.5		2705.4	β -CN (102-124)	MAPKHKEMPFKYPVEPFESQS	
2574.4		2574.3	β -CN (103-124)	APKHKEMPFKYPVEPFESQS	
2278.2		2278.1	β -CN (106-124)	HKEMPFKYPVEPFESQS	
1910.1		1910.0	β -CN (139-154)	LLQSWMHQPHQPLPPT	
2069.1		2069.0	β -CN (144-161)	MHQPHQPLPPTVMFPPQS	
2008.1	2008.2	β -CN (191-208)	LLYQEPVLPVVRGPFPII		

^a O número do pico corresponde a Figura 19.

Tabela 3 - Continuação: Peptídeos Identificados de β -caseína a partir do extrato aquoso de queijo Coalho da região de Jaguaribe-CE.

Número do Pico ^a	Massa Molecular (Da)		Fragmento Proteína	Sequência Peptídeo
	obsd	calcd		
19	1566.0	1565.8	β -CN (59-72)	VYFPFGPIHNSLPQ
	2990.9	2990.6	β -CN (163-189)	LSLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQA
	2790.8	2790.5	β -CN (165-189)	LSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQA
20	2728.7	2728.4	β -CN (97-119)	KVKEAMAPKHKEMPFPKYPVEPF
	2599.7	2599.4	β -CN (98-119)	VKEAMAPKHKEMPFPKYPVEPF
	2042.2	2042.1	β -CN (103-119)	APKHKEMPFPKYPVEPF
	1874.1	1874.0	β -CN (105-119)	KHKEMPFPKYPVEPF
	2013.0	2012.9	β -CN (108-124)	EMFPKYPVEPFOTESQS
	2168.3	2168.1	β -CN (144-162)	MHQPHQLPPTVMFPPQSV
	2824.5	2824.5	β_{A2} -CN (166-190)	SQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAF
	2609.4	2609.4	β_{A2} -CN (168-190)	SKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAF
	1458.9	1458.7	β -CN (193-205)	YQEPVLGPVRGPF
	1392.9	1392.8	β -CN (194-206)	QEPVLGPVRGPF
21	1678.8	1678.9	β -CN (58-72)	LVYFPFGPIHNSLPQ
	2173.3	2173.1	β -CN (102-119)	MAPKHKEMPFPKYPVEPF
	1746.0	1745.9	β -CN (106-119)	HKEMPFPKYPVEPF
	2937.9	2937.5	β_{A2} -CN (165-190)	LSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAF
	2394.5	2394.2	β -CN (170-190)	VLPVPQKAVPYPQRDMPIQAF
	1556.0	1555.8	β -CN (193-206)	YQEPVLGPVRGPF
22	2368.4	2368.2	β -CN (144-164)	MHQPHQLPPTVMFPPQSVLS
23	1480.8	1480.7	β -CN (108-119)	EMFPKYPVEPF
	1351.8	1351.7	β -CN (109-119)	MPFPKYPVEPF
	2696.5	2696.4	β -CN (139-161)	LLQSWMHQPHQLPPTVMFPPQS
	3237.0	3236.8	β -CN (162-190)	VLSLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAF
	3137.9	3137.7	β_{A2} -CN (163-190)	LSLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAF
24	1669.0	1668.9	β -CN (193-207)	YQEPVLGPVRGPFPI
	1505.8	1505.8	β -CN (194-207)	QEPVLGPVRGPFPI
	1377.9	1377.8	β -CN (195-207)	EPVLGPVRGPFPI
25'	1057.6	1057.5	β -CN (85-93)	PPFLQPEVM
25	1895.3	1895.1	β -CN (191-207)	LLYQEPVLGPVRGPFPI
	1782.2	1781.9	β -CN (192-207)	LYQEPVLGPVRGPFPI
26	1782.2	1781.9	β -CN (193-208)	YQEPVLGPVRGPFPII
	1881.3	1881.1	β -CN (193-209)	YQEPVLGPVRGPFPIIV
27	2580.6	2580.4	β -CN (133-154)	LHLPLLLQSWMHQPHQLPPT
28	1147.7	1146.6	β -CN (85-94)	PPFLQPEVMG

^a O número do pico corresponde a Figura 19.

O segmento de peptídeo β -CN (58-72) presente no queijo Coalho de Jaguaribe também foi encontrado em queijo muzzarella tendo uma ação anti-hipertensiva como inibidor da enzima conversora de angiotensina (KORHONEN; PIHLANTO, 2006). Yamamoto *et al.* (1994) e Sforza *et al.* (2003) relataram o segmento (193-202) de β -caseína como um inibidor da enzima conversora de angiotensina, esse peptídeo bioativo também foi encontrado no queijo Coalho de Jaguaribe. Assim, muitos péptidos bioativos foram isolados e identificados do queijo tradicional brasileiro estudado. Os péptidos com valores de massa molecular inferior a 500 Da podem também estar presentes no extrato aquoso do queijo, mas eles não são adequados para serem analisados por espectrometria de massa MALDI-TOF, portanto, eles não foram encontrados neste estudo.

Peptídeos derivados de α -Caseína e κ -Caseína

Muitos peptídeos correspondentes à parte do N-terminal da α_{s1} -caseína foram encontrados no extrato aquoso de queijo Coalho de Jaguaribe (Tabela 4). Atividade anti-hipertensiva tem sido atribuída a um destes peptídeos, o que corresponde ao segmento (1-9) (SAITO, *et al.*, 2000; KORHONEN; PIHLANTO, 2006; ONG; SHAH, 2008). Peptídeo (1-23) de α_{s1} -caseína, também encontrada no queijo artesanal de Jaguaribe (Tabela 4), foi relatado por Silva e Malcata (2005) como imunomodulador e antimicrobiano. Piraino, *et al.* (2007) mostraram que esse peptídeo é comumente encontrado em muitas variedades de queijo, como Edam, Cooleeney, Camembert, Swiss, Parmigiano-Reggiano, Port du Salut, Cheddar e Gruyere. Foi encontrado no queijo Coalho artesanal de Pernambuco através da hidrólise da ligação Phe₂₃-Phe₂₄ peptídeo catalisado pela quimosina bovina. Este peptídeo foi também descrito como um largo espectro de peptídeos antimicrobianos em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (HAYES, *et al.*, 2006). Peptídeos antimicrobianos encontrados no queijo Coalho apresentam um grande potencial para utilização na medicina preventiva ou na indústria de alimentos e pode representar uma fonte de saúde, podendo ser considerado um alimento funcional (SILVA, *et al.*, 2012). No entanto, é importante salientar que este peptídeo não é útil como um marcador para a origem ou a variedade de queijo, devido à sua ampla distribuição.

As regiões N-terminal e C-terminal são normalmente consideradas como peças flexíveis na estrutura da proteína e, assim, a formação de diversos peptídeos na parte N-terminal da α_{s1} -caseína não é inesperado. A partir do primeiro resíduo até o resíduo 39, muitos dos segmentos peptídicos derivados de α_{s1} -caseína estão presentes no extrato aquoso de queijo Coalho. No entanto, os peptídeos correspondentes aos resíduos de aminoácidos 40-79 estão ausentes no perfil do peptídeo associado à separação cromatográfica. É provável que esta região seja protegida da ação da peptidase por uma estrutura mais rígida ou pelas associações de micelas de caseína (HORNE, 2002). Após esta região e até próximo do C-terminal da proteína, poucos peptídeos foram observados a partir da hidrólise de α_{s1} -caseína. O peptídeo correspondente ao segmento (85-91) de α_{s1} -caseína (Tabela 4) é um inibidor da enzima conversora de angiotensina e, portanto, um peptídeo anti-hipertensivo (GOMEZ-RUIZ, *et al.*, 2004). Apenas cinco peptídeos derivados da ação de peptidases sobre α_{s2} -caseína foram identificados no sequenciamento dos peptídeos (Tabela 4), onde três deles estão no segmento (99-115) da proteína. Na fabricação do queijo Ragusano esta região da α_{s2} -caseína parece também acessível à ação de peptidases, uma vez que os peptídeos correspondentes aos segmentos (100-114) e (100-115) a partir de α_{s2} -caseína estão presentes no queijo Coalho Jaguaribe e na superfície do queijo Italiano Ragusano (GAGNAIRE, *et al.*, 2011). Peptídeo (189-197) de α_{s2} -caseína, também encontrado no queijo artesanal Jaguaribe (Tabela 4), foi relatado por Silva e Malcata (2005) como anti-hipertensivo.

A estrutura das caseínas em seu meio natural é uma questão complexa, que certamente afeta a sua acessibilidade a peptidases. A conformação globular da caseína tem sido proposta, mas ainda é uma questão controversa. No entanto, é evidente que elas têm estruturas terciárias especiais com algumas áreas rígidas e algumas muito flexíveis que seriam mais acessíveis à hidrólise por peptidases. Associação de cadeias de caseína de modo a formar micelas torna mais difícil a previsão de prováveis locais de clivagem durante a produção de queijo (FARRELL JR. *et al.*, 2002; HORNE, 2002). No entanto, algumas “pistas” derivadas da estrutura da caseína podem ser úteis para uma melhor compreensão do perfil de hidrólise das proteínas.

Tabela 4: Peptídeos Identificados de α -caseína e κ -caseína a partir do extrato aquoso de queijo Coalho da região de Jaguaribe-CE.

Número do Pico ^a	Massa Molecular (Da)		Fragmento Proteína	Sequência Peptídeo
	obsd	calcd		
1	703.3	703.4	α_{s2} -CN (184-188)	YQHQQ
	1098.7	1098.6	α_{s2} -CN (189-197)	AMKPWIQPK
2	851.4	851.4	K-CN (96-102)	ARHPPH
3	1139.4	1140.7	α_{s1} -CN (1-9)	RPKHPIKHQ
4	1141.6	1141.6	K-CN (2-10)	EQNQEQPIR
	1083.8	1083.5	K-CN (94-102)	TMARHPPH
	845.5	845.4	K-CN (95-101)	MARHPPH
5	1337.6	1337.7	α_{s1} -CN (80-90)	HIQKEDVPSER
	1223.5	1223.5	α_{s1} -CN (110-119)	EIVPNS(PHOSPHO)AEER
6	1282.9	1282.7	α_{s1} -CN (3-13)	KHPIKHQGLPQ
	1154.6	1154.6	α_{s1} -CN (4-13)	HPIKHQGLPQ
	865.5	865.4	α_{s1} -CN (85-91)	DVPSERY
7	1536.0	1535.9	α_{s1} -CN (1-13)	RPKHPIKHQGLPQ
	1665.1	1664.9	α_{s1} -CN (1-14)	RPKHPIKHQGLPQE
11	1991.2	1991.1	α_{s1} -CN (1-17)	RPKHPIKHQGLPQEVLN
12	1991.2	1991.1	α_{s1} -CN (1-17)	RPKHPIKHQGLPQEVLN
13	2234.2	2234.2	α_{s1} -CN (1-19)	RPKHPIKHQGLPQEVLNEN
15	1877.1	1877.1	α_{s1} -CN (1-16)	RPKHPIKHQGLPQEVL
	1099.7	1099.6	α_{s1} -CN (14-22)	EVLNENLLR
	905.6	905.5	α_{s1} -CN (17-23)	NENLLRF
20	1831.1	1831.0	α_{s2} -CN (100-114)	YQGPIVLNPWDQVQR
	1927.2	1927.1	α_{s2} -CN (100-115)	YQGPIVLNPWDQVQRN
22	1926.2	1926.1	α_{s2} -CN (99-114)	LYQGPIVLNPWDQVQR
23	2763.5	2763.6	α_{s1} -CN (1-23)	RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF
	1246.6	1246.7	α_{s1} -CN (14-23)	EVLNENLLRF
	1594.0	1593.9	α_{s1} -CN (24-37)	FVAPFPEVFGKEKV
	1708.1	1707.9	α_{s1} -CN (24-38)	FVAPFPEVFGKEKVN
	1837.1	1837.0	α_{s1} -CN (24-39)	FVAPFPEVFGKEKVNE
24	1237.8	1237.7	α_{s1} -CN (24-34)	FVAPFPEVFGK
25	1642.0	1642.0	α_{s1} -CN (10-23)	GLPQEVLNENLLRF

^a O número do pico corresponde a Figura 19.

κ -caseína tem uma estrutura rígida entre os resíduos 14 a 64 e uma região de grande flexibilidade dos resíduos 105-106 (FARRELL JR et al., 2002). Na verdade, apenas alguns peptídeos encontrados no queijo Coalho da região de Jaguaribe eram de κ -caseína, as quatro moléculas são encontrados a partir da secção N-terminal da área flexível. No entanto, os resultados aqui relatados referem-se apenas aos peptídeos que foram identificados por sequenciamento após a dissociação por espectrometria de massa, pode-se esperar encontrar outros peptídeos derivados desta região mais flexível da κ -caseína. O peptídeo correspondente ao segmento (96-102) de κ -caseína (Tabela 4) foi também identificado por Gómez-Ruiz *et al.* (2004) em sua investigação com a variedade de queijo Manchego e por Ong e Shah, (2008), como peptídeo anti-hipertensivo.

Portanto, o queijo Coalho de Jaguaribe parece ser uma fonte potencial de péptidos com atividade biológica e esses peptídeos podem representar uma fonte de componentes que melhoram a saúde, apresentando características de alimentos funcionais ou incorporados em produtos farmacêuticos ou preparações nutraceuticas desde que devidamente testados. Somados ao fato que a análise e caracterização dos peptídeos da região demarcada pode ser o primeiro passo para atribuição da origem geográfica deste tradicional queijo brasileiro, principalmente pelo fato da grande distinção entre os peptídeos identificados nos queijos de Jaguaribe e os encontrados por Silva *et al.* (2012) no queijo Coalho de Pernambuco onde apenas 12 peptídeos foram idênticos entre os queijos produzidos nestas duas regiões.

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entre os derivados lácteos produzidos e consumidos no Nordeste do Brasil o queijo Coalho ocupa lugar de destaque, pela sua tradição e aceitabilidade pela população local, sendo um alimento de grande destaque na gastronomia regional. Este queijo é produzido em toda região Nordeste, no entanto, nos últimos anos tem-se notado uma tendência de produção deste produto em estados do Centro Oeste, Sul e Sudeste em decorrência da grande aceitação deste queijo nestas regiões. Portanto, em decorrência da tendência de fabricação deste queijo em outras regiões não características da origem de produção, faz-se necessário, a caracterização e demarcação destas áreas para proteção deste queijo. Neste contexto, a região de Jaguaribe no Ceará detém a fama da produção de queijos com características específicas e distintas dos produzidos nas demais regiões do Estado.

Este trabalho objetivou identificar e caracterizar o queijo Coalho de Jaguaribe com indicadores bioquímicos, proteômicos, físico-químicos e sensoriais para obtenção de informações que fornecerão suporte a um futuro processo de indicação geográfica. Para alcançar estes objetivos inicialmente mapearam as regiões produtoras de leite do Estado do Ceará onde foi possível observar que a região do Jaguaribe está localizada entre as principais bacias do Estado, estando esta região localizada nas bacias leiteiras do Médio Jaguaribe, Alto Salgado e Quixeramobim. Seguido da demarcação e mapeamento da área pertencente ao Vale do Jaguaribe e identificação e localização precisa das queijarias inseridas na região demarcada. Após esta fase foi realizada a identificação do processo de fabricação do tradicional queijo Coalho de Jaguaribe-CE através de visitas para observação do processo, da aplicação de questionários e caracterização sensorial realizada por produtores e mestres queijeiros que detém o “saber fazer”, onde foi possível identificar que o tradicional queijo de Jaguaribe deve apresentar textura flexível, uniforme e de massa lisa após o corte. O formato deve ser redondo, a cor amarela claro, e sabor levemente salgado, com leve acidez.

A caracterização físico-química dos queijos da região demarcada foi monitorada por dois anos, mostrando que houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os queijos analisados quando comparados os parâmetros acidez, pH e gordura. Não havendo diferenças significativas ($p < 0,05$) quanto à cinzas e umidade.

Apesar destas diferenças, os parâmetros físico-químicos observados estão dentro das normas brasileiras para este produto.

A partir desta fase, foi realizado um estudo pioneiro utilizando eletroforeses uni e bidimensional, mostrando que o queijo Coalho de Jaguaribe apresenta um perfil característico e similar entre eles com presença da alfa e beta caseína tanto em presença de SDS como uréia após coloração de Coomassie e revelação com nitrato de prata. A revelação com prata mostrou melhor resultado para observação de peptídeos que a coloração de Coomassie. A alfa caseína mais facilmente hidrolisada que a beta caseína permitindo observar que a partir do momento em que ocorre diminuição desta proteína possíveis problemas tecnológicos podem ser responsáveis. Portanto, esta proteína é uma possível “candidata” a marcador molecular para identificar possíveis problemas durante o processo tecnológico do queijo Coalho de Jaguaribe.

Eletroforeses bidimensional foram realizadas mostrando a caracterização tradicional por separação utilizado isoeletrofocalização (IEF)/SDS e uma nova metodologia utilizando Ureia/SDS podendo ser possível separa as proteínas dos queijo Coalho de Jaguaribe utilizando estas técnicas. Sendo eletroforese 2D uma técnica promissora para realização de futuros estudos proteômicos com realização de mapas peptídicos destes queijos.

A caracterização cromatográfica de queijos Coalhos de Jaguaribe da região demarcada foi realizada utilizando HPLC mostrando excelentes perfis cromatográficos com grande repetibilidade apresentando dois picos majoritários a aproximadamente 16.989 e 39.907 minutos. A comparação dos perfis cromatográficos de queijos da região de Jaguaribe com os produzidos no Rio grande do Norte e Pernambuco mostrou perfis distintos entre eles. No entanto, esta diferença foi marcante quando comparados os queijos Coalhos de Jaguaribe com os produzidos em Pernambuco. Estes resultados foram bastante promissores para serem utilizados como técnica diferenciadora entre queijos Coalhos produzidos nas diferentes regiões de produção, necessitando de maiores estudos para verificar a influência de períodos secos e chuvosos, tempo de acondicionamento destes produtos, etc. Em decorrência destes resultados promissores foram coletadas 28 frações cromatográficas e após “repurificadas” foram submetidas a sequenciamento

por espectrometria de massa. Foi possível identificar precisamente 109 peptídeos. Destes peptídeos, 18 foram identificados como fosforilados onde um foi originado da α _{s1}-CN e 17 da β -caseína. O peptídeo β -CN (193-209) identificado neste estudo possui propriedades imunomoduladoras, antimicrobiana e anti-hipertensiva. O peptídeo (145-154) a partir da β -caseína possui atividade imunomoduladora. Os peptídeos β -CN (58-72), β -CN (193-202), α _{s1}-CN (1-9), α _{s1}-CN (85-91) apresentam atividade anti-hipertensiva assim como α _{s2}-CN (189-197) e (96-102) de κ -caseína. Enquanto que o peptídeo obtido da α _{s1}-CN (1-23), apresenta atividade imunomoduladora e antimicrobiana.

A comparação dos peptídeos identificados em Jaguaribe com os observados na literatura obtidos do queijo Coalho de Pernambuco apenas 12 peptídeos foram idênticos comprovando que apesar de ambos os queijos serem denominados de Coalho os mesmos possuem característica proteômicas que os diferencia precisamente. Sendo a fração majoritária eluída a 16.989 minutos um dos potenciais marcadores para diferenciar o queijo de Jaguaribe do de Pernambuco visto que nenhum peptídeo idêntico foram observado nesta fração. Em decorrência dos resultados obtidos com este estudo, o mesmo poderá servir como base para certificação de produtos lácteos no Brasil principalmente pela precisão das técnicas utilizadas.

Portanto, este estudo pode ser considerado pioneiro para identificação e caracterização através de técnicas bioquímicas e proteômicas de um queijo brasileiro mostrando o “caminho” para realização de futuros estudos visando IG em outros queijos tradicionais brasileiros como o Serro em Minas Gerais, o Colonial no rio Grande do sul, ou mesmo identificar novas áreas geográficas para de produção do queijo Coalho.

7- CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A demarcação precisa da região a ser estudada, seguida da identificação do processo utilizado pelos mestres queijeiros na fabricação dos produtos e a escolha dos parâmetros sensoriais característicos dos queijos da região demarcada, são parâmetros imprescindíveis para início dos estudos de qualquer processo de IG. Com intuito, de identificar precisamente as amostras a serem submetidas a análises físico-químicas, bioquímicas e proteômicas.

Os parâmetros físico-químicos que variaram significativamente entre os dois anos sucessivos foram: teor de gordura, pH e o teor de umidade, influenciando a atividade enzimática e assim, a especificidade e a natureza dos peptídeos gerados a partir da hidrólise da caseína. Apesar das diferenças, os parâmetros físico-químicos observados estão dentro das normas para este produto, sendo classificado como queijo de média umidade, massa semidura e semi-gordo.

As eletroforeses em presença de SDS (PAGE-SDS) e uréia (PAGE-uréia) podem ser utilizadas em estudos do queijo Coalho de Jaguaribe em decorrência da similaridade dos perfis eletroforéticos entre produtores, principalmente para verificar possíveis problemas tecnológicos. O gel em presença de ureia e corado com coloração de prata foi melhor para observar a presença dos peptídeos.

As análises cromatográficas mostraram ser eficientes para análise do queijo Coalho de Jaguaribe em decorrência da repetibilidade do método, mostrando picos bem definidos. Através dos perfis cromatográficos obtidos possível diferenciar queijos Coalhos produzido em distintas regiões.

Em decorrência da presença de peptídeos bioativos anti-hipertensivos, antioxidantes, antimicrobianos e imunomoduladores, o queijo Coalho de Jaguaribe apresenta potencial para ser utilizado como alimento funcional.

A caracterização analítica pode ser um primeiro passo para a atribuição da identificação geográfica ou mesmo uma denominação de origem para este queijo tradicional brasileiro, principalmente pela grande diferença existente entre o queijo produzido em Jaguaribe e em Pernambuco, cujos queijos podem receber a denominação de coalho apesar das diferenças bioquímicas e proteômicas entre os mesmos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADDEO, F.; CHIANESE, L.; SACCHI, R.; MUSSO, S.S.; FERRANTI, P.; MALORNI, A. Characterization of the oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese soluble in 120 g trichloroacetic acid/l. **J.Dairy Res.** v. 61, p. 365-374. 1994.

ADDEO, F.; CHIANESE, L.; SALZANO, A.; SACCHI, R.; CAPPUCCIO, U.; FERRANTI, P.; MALORNI, A. "Characterization of the 12% trichloroacetic acid-insoluble oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese". **J.Dairy Res.** v. 59, p. 401-411. 1992.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v.422, n.6928, p.198-207, 2003.

ALBUQUERQUE, L. C; CASTRO, M. C. D. Do leite ao queijo de cabra. A história, a tecnologia, o mercado. **EPAMIG/CEPE/ILCT**. 162p. 1996.

ALLI, I.; OKONIEWSKA, M.; GIBBS, B. F.; KONISHI, Y. Identification of peptides in Cheddar cheese by electrospray ionization mass spectrometry. **International Dairy Journal**. v. 8, p. 643–649. 1998.

AMIGO, L.; RAMOS, M.; MARTIN-ALVAREZ, P.J. "Effect of technological parameters on electrophoretic detection of cow's milk in ewe's milk cheeses", **J. Dairy Sci.**, v. 74, n. 5, p. 1482-1490. 1991.

ANDRADE, A. A. de. **Estudo do perfil sensorial, físico-químico e aceitação de queijo Coalho produzido no Estado do Ceará**. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE. 127f. 2006.

ANGELETTI, R.; GIOACCHINI, A.M.; SERAGLIA, R.; PIRO, R.; TRALDI, P. The potential of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in the quality control of water buffalo Mozzarella cheese. **Journal of Mass Spectrometry**. P. 525-531, 1998.

ANUÁRIO. Leite em números. Leite & Negócios consultoria – ano 2. Ceará 2011.

AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International (17th ed., Vol. 1). Washington, **DC: Association of Official Analytical Chemists**. 2000.

AQUINO, F. T. M. **Produção do queijo de coalho no Estado da Paraíba: acompanhamento das características físico-químicas do processamento**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal da Paraíba. 74f. 1983.

BASCH, J. J.; DOUGLAS, JR. F. W.; PROCINO, L. G.; HOLSINGER, V. H.; FARRELL JR., H. M. "Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with Harland-Ashworth procedure". **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 1, p. 23- 31. 1985.

BENEVIDES, S. D.; TELLES, F. S. S.; GUIMARÃES, A. C. L.; RODRIGUES, M. C. P. **Estudo bioquímico e sensorial do queijo de coalho produzido com leite cru e pasteurizado no estado do Ceará**. B.Ceppa, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 193-208, 2000.

BHASKARACHARYA, R. K.; SHAH, N. P. Texture and microstructure of skim milk Mozzarella cheeses made using fat replacers. **Australian Journal of Technology Dairy**. v. 56, p. 9–14. 2001.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSSA, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA e DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p.93-99. 1987.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. São Paulo, Varela, 1992.

BOUTROU, R.; MOLLE, D.; LEONIL, J. Action of the lactococcal proteinase during Camembert-type curd making. **International Dairy Journal**. v. 11, p. 347-354. 2001.

BRASIL Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria n. 146, de 07 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 11 de março 1996, Seção 1, 3977–3978. Brasil. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria do Desenvolvimento Agrário. Instrução Normativa Nº 30, de 26 de junho de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. **Diário Oficial da União**. Brasília, 16 de julho de 2001.

BREWER, G. J.; SING, C. F. An Introduction to isozyme techniques. **New York: Academic Press**. v. 25, 186p. 1970.

BROADBENT, J. R.; STRICKLAND, M.; WEIMER, B.C.; JOHNSON, M. E; STEELE, J.L. Peptide accumulation and bitterness in Cheddar cheese made using single-strain *Lactococcus lactis* starters with distinct proteinase specificities. **Journal of Dairy Science**. v. 81, p. 327–337. 1998.

BUCHIN, S.; MARTIN, B.; DUPONT, D.; BORNARD, A.; ACHILLEOS, C. Influence of the composition of Alpine highland pasture on the chemical, rheological and sensory properties of cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 81, p. 579–588. 1999.

BUGAUD, C.; BUCHIN, S.; COULON, J.-B.; HAUWUY, A.; DUPONT, D. Influence of the nature of alpine pastures on plasmin activity, fatty acid and volatile compound composition of milk. **Lait**, v. 81, p. 401–414. 2001.

BÜTIKOFER, U.; MEYER, J.; SIEBER, R.; WALTHER, B.; WECHSLER, D. Occurrence of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in different cheese varieties of Swiss origin. **Journal of Dairy Science**. v. 91, p. 29–38. 2008.

BUZI, K. A.; PINTO, J. P. de A. N.; RAMOS, P. R. R.; BIONDI, G. F. Análise microbiológica e caracterização eletroforética do queijo mussarela elaborado a partir de leite de búfala. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29p. 7-11, 2009.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v.25, n.9, p.1327-1333, 2004.

CASPER, J. L.; WENDORFF, W. L.; THOMAS, D. L. "Seasonal changes in protein composition of whey from commercial manufacture of caprine and ovine specialty cheeses". **Journal of Dairy Science**. v. 81, n. 12, p. 3117-3122. 1998.

CATTANEO, T. M. P.; NIGRO, F.; GREPPI, G. F. Analysis of cows', goats' and ewes' milk mixtures by capillary zone electrophoresis (CZE): preliminary approach. **Milchwissenschaft**, v.51, p.616-619, 1996.

CAVALCANTE, J. F. M.; ANDRADE, N. J.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F.; PINTO; L. O.; ELARD, E. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 205-214, 2007.

CHIANESE, L.; GARRO, G.; NICOLAI, M. A.; MAURIELLO, R.; FERRANTI, P.; PIZZANO, R.; CAPPUCCIO, U.; LAEZZA, P.; ADDEO, F.; RAMUNO, L.; RANDO, A.; RUBINO, R. A natureza da beta -caseína heterogeneidade no leite de caprinos.; **Lait**. v. 73, p. 533-547, 1993.

COSTA SOBRINHO, P. de S.; MARÇAL, de FARIA, C. A.; SILVA PINHEIRO, J.; GONÇALVES de ALMEIDA, H.; VIEIRA PIRES, C. & SILVA SANTOS, A. Bacteriological quality of raw milk used for production of a Brazilian farmstead raw milk cheese. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 2, p.138-144. 2012.

COSTA, M. R.; SOUSA, C. do S. M. de. **Manual de eletroforese de isoenzimas em gel de poliacrilamida**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 28p. 1999.

COZZOLINO, R.; PASSALACQUA, S.; SALEMI, S.; GAROZZO, D. Identification of adulteration in water buffalo Mozzarella and in ewe cheese by using whey proteins as biomarkers and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**. v.37, p. 985–991. 2002.

COZZOLINO, R.; PASSALACQUA, S.; SALEMI, S.; MALVAGNA, P.; SPINA, E.; GAROZZO, D. Identification of adulteration in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**. v. 36, p. 1031–1037. 2001.

DASS C. Princípios e prática da espectrometria de massa biológica. **New York: Wiley.** 2000.

DE SIMONE, S. G. **A arte de purificação e caracterização de proteínas.** Fortaleza. RDS, 217p. 2008.

DI CAGNO, R.; BANKS, J., SHEEHAN, L., FOX, P. F.; BRECHANY, E. Y. Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewes' milk cheeses. **International Dairy Journal**, v.13, p. 961-972, 2003.

DI STEFANO, V.; AVELLONE, G.; BONGIORNO, D.; CUNSOLO, V.; MUCCILLI, V.; SFORZA, S.; DOSSENA, A.; DRAHOS, L.; VEKEY, K. Applications of liquid chromatography–mass spectrometry for food analysis. **Journal of Chromatography A**. v. 1259, p. 74– 85. 2012.

DIAS, J. C. **Uma longa e deliciosa viagem: o primeiro livro da história do queijo no Brasil.** 1 ed. Editora Barleus. São Paulo, 167p. 2010.

DUARTE, D. A. M.; SCHUCH, D. M. T.; SANTOS, S. B.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SILVA, J. V. D.; MOTA, R .A. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higienico-sanitarios em queijo de coalho produzido e comercializados no estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biologico de Sao Paulo**, v.72, p.297-302, 2005.

DUPAS, C.; ADT, I.; COTTAZ, A.; BOUTROU, R.; MOLLE, D.; JARDIN, J.; JOUVET, T.; DEGRAEVE, P. A chromatographic procedure for semi-quantitative evaluation of caseinphosphopeptides in cheese. **Dairy Science and Technology**. v. 89, p. 519 – 529, 2009.

EGITO, A. S. DO; SANTOS, K. M. O. DOS; BENEVIDES, S. D.; PEREIRA, S. C.; LAGUNA, L. E. **Processamento Artesanal de Queijo do Sertão Fabricado com Leite de Cabra.** Comunicado Técnico, n. 93, 2008.

EGITO, A. S.; GIRARDET, J. M.; MICLO, L.; MOLLÉ, D.; HUMBERT, G.; Gaillard, J.L. Susceptibility of equine κ - and β -caseins to hydrolysis by chymosin. **International Dairy Journal**.v. 11, p. 885–893, 2001.

EGITO, A. S.; LAGUNA, L. E. **Fabricação de queijo de coalho com leite de cabra.** Sobral: Embrapa Caprinos, 15 p. (Embrapa Caprinos. Circular Técnica, 16). 1999.

EGITO, A. S.; GIRARDET, J. M.; LAGUNA, L. E.; POIRSON, C.; MOLLÉ, D.; MICLO, L.; HUMBERT, G.; GALLARD, J. L. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 816-825, 2007.

EGITO, A. S.; MICLO, L.; LOPES, C.; ADAM, A.; GIRARDET, J. M.; GALLARD, J. L. Separation and characterization of mares' milk α_{s1} -, β -, κ -casein, γ -casein-like, and proteose peptone components 5-like peptides. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 697-706, 2002.

EGITO, A.S.; ROSINHA, G.M.S.; LAGUNA, L.E.; MICLO, L.; GIRARDE, J.M.; GAILLARD, J.L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.932-939, 2006.

ENNE, G.; ELEZ, D.; FONDRINI, F.; BONIZZI, I.; FELIGINI, M.; ALEANDRI, R. High-performance liquid chromatography of governing liquid to detect illegal bovine milk addition in water buffalo Mozzarella: Comparison with results from raw milk and cheese matrix. **Journal of Chromatography A**. v. 1094, p. 169-178, 2005.

FALEIRO, A. dos S. **Caracterização eletroforética, composição centesimal e propriedades físicas para verificação da autenticidade da muçarela de búfala comercializada no estado da Bahia.** Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB – Campus de Itapetinga. 71f. 2013.

FANTON, C., DELOGU, G., MACCIONI, E., PODDA, G., SERAGLIA, R., TRALDI, P. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in the dairy industry 2. The protein fingerprint of ewe cheese and its application to detection of adulteration by bovine milk. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. p. 1569-1573. 1998.

FARINA, E. M. Q.; ZYLBERSZTAJN, D. **Competitividade e organização das cadeias agroindustriais.** Costa Rica, Relatório II CA, 63p. 1994.

FARKYE, N. Y.; FOX, P. F. Objective indices of cheese ripening. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v.1, n.2, p.37-40, 1990.

FARRELL JR, H. M.; QI, P. X.; BROWN, E. M.; COOKE, P. H.; TUNICK, M. H.; WICKHAM, E. D.; UNRUCH, J. J. Molten globule states in milk proteins: Implications for potential new structure-function relationships. **Journal of Dairy Science**, v. 85 n. 3, p. 459-471. 2002.

FEDELE, L., SERAGLIA, R., BATTISTOTTI, B. PINELLI, C., TRALDI, P. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for monitoring bacterial protein digestion in yogurt production. **Journal of Mass Spectrometry**. v. 34 n. 12, p.1338-1345. 1999.

FEENEY, E. P.; GUINEE, T. P.; FOX, P. F. Effect of pH and calcium concentration on proteolysis in Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1646–1654. 2002.

FEITOSA, T. **Estudos tecnológicos, físico-químicos, microbiológicos e sensoriais do queijo de coalho do Estado do Ceará**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará, 96 f. 1984.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de Salmonella sp., Listeria sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 162-165. 2003.

FENNEMA, R. O. Princípios de Engenharia de Alimentos. Segunda **Edição**, **Food Science** série de Tecnologia, Marcel Dekker, Inc., AVI, New York, 632p. 1997.

FERRANTI, P., BARONE, F., CHIANESE, L., ADDEO, F., SCALONI, A., PELLEGRINO, L. e RESMINI, P. "Phosphopeptides from Grana Padano cheese: nature, origin and changes during ripening", **Journal Dairy Research**. v. 64, p. 601-615. 1997.

FERRANTI, P.; MALORNI A.; NITTI, G.; LAZZA, P.; PIZZANO, R.; CHIANESE, L.; ADDEO, F. Primary structure of ovine alpha s1-caseins: localization of

phosphorylation sites and characterization of genetic variants A, C and D. **Journal. Dairy Research.** v. 62, p. 281-296. 1995

FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; CAÇOTE, H. Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reverse-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins. **Journal Chromatography A.** v. 1015, p. 111-118. 2003.

FERREIRA, W. L.; FREITAS FILHO, JR. de. Avaliação da Qualidade Físico - Químicos do Queijo Coalho Comercializado no Município de Barreiros-PE. A **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 2, n. 1, p. 127-133. 2008.

FITZGERALD, R. J.; MURRAY, B. A. & WALSH, D. J. Hypotensive peptides from milk proteins. **Journal of Nutrition**, v.134, p. 980–988. 2004

FITZGERALD, R. J.; MEISEL, H. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In: P.F. Fox, & P.L.H. McSweeney (Eds.), *Advanced dairy chemistry*, Vol. 1: **Proteins** New York, NY, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers. v. 3 p. 675–698. 2003.

FURTADO, M. M. Queijos do Serro: tradição na história do povo mineiro. **Informativo Agropecuário**, v.7, nº 77, 1981.

GAGNAIRE V, MOLLÉ D, HERROUIN M & LÉONIL J. Peptides identified during Emmental cheese ripening: origin and proteolytic systems involved. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p.4402-4413. 2001

GAGNAIRE, V.; CARPINO, S.; PEDILIGGIERI, C.; JARDIN, J.; LORTAL, S.; LICITRA, G. Uncommonly thorough hydrolysis of peptides during ripening of ragusano cheese revealed by tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 59, n. 23, p.12443-12452. 2011.

GALLE, S.A.; KOOT, A.; SOUKOULIS, C.; CAPPELLIN, L.; BIASIOLI, F.; ALEWIJN, M. & VAN RUTH, S. M. Typicality and geographical origin markers of protected origin cheese from the Netherlands revealed by PTR-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p.2554-2563. 2011.

GIESBRECHT, H. O. **Indicações geográficas brasileiras: Brazilian geographical indications: indicaciones geográficas brasilenhas.** SEBRAE, INPI, 148 p. 2011.

GIROTO, J. M. **Soro de leite nos laticínios do estado do Paraná: potencial, oportunidades e restrições.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, 120p. 2001.

GOBBETTI, M.; BURZIGOTTI, R.; SMACCHI, E.; CORSETTI, A.; DE ANGELIS, M. Microbiology and biochemistry of Gorgonzola cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 519–529. 1997b.

GOBBETTI, M.; LONEY, S.; SMACCHI, E.; BATTISTOTTI, B.; DAMIANI, P.; FOX, P. F. Microbiology and biochemistry of Taleggio cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 509–517. 1997a.

GOBBETTI, M.; MOREA, M.; BARUZZI, F.; CORBO, M. R.; MATARANTE, A.; CONSIDINE, T.; DI CAGNO, R.; GUINEE, T.; FOX, P. F. Microbiological, compositional, biochemical and textural characterisation of Caciocavallo Pugliese cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 511–523. 2002.

GOMEZ-RUIZ, J. A.; RAMOS, M.; RECIO, I. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 697–706. 2002.

GOMEZ-RUIZ, J. A.; RAMOS, M.; RECIO, I. Identification and formation of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheese by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 269–277. 2004.

GOMEZ-RUIZ, J.; TABORDA, G.; AMIGO, L.; RECIO, I.; RAMOS, M. Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. **European Food Research and Technology**, v. 223, p. 595–601. 2006.

GORG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; WEISS, W. Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. **Electrophoresis**, v.20, n.4/5, p.712-717, 1999.

GOULDSWORTHY, A. M.; LEAVER, J.; BANKS, J. M. Application of a mass spectrometry sequencing technique for identifying peptides present in Cheddar cheese. **International Dairy Journal**. v. 6, p. 781-790. 1996.

GRAPPIN, R.; RIBADEAU-DUMAS, B. "Analytical methods for milk proteins", in P.F. Fox (editor), **Advanced dairy chemistry - 1: Proteins**, Blackie Academic & Professional, London, 2ª edição, Capítulo 1, p. 1-62. 1992.

GUPTA, A.; MANN, B.; KUMAR, R.; SANGWAN, R. B. Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, p. 339–347. 2009.

GURGEL, M. S. C. C. A. Efeito da radiação gama na resistência aos *Staphylococcus aureus* e nas propriedades físico-químicas e sensoriais do queijo Minas Frescal. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear da Agricultura, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 81p. 2000.

HAYES, M.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; HILL, C. STANTON, C. Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 2260–2264. 2006.

HORNE, D. S. Casein structure, self-assembly and gelation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 7, p. 456-461. 2002.

IAMETTI, S.; TEDESCHI, G.; OUNGRE, E.; BONOMI, F. Primary structure of K-casein isolated from mares' milk. **Journal of Dairy Research**. v. 68, p. 53-61, 2001.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA / Pesquisa da Pecuária Municipal e Censo Agropecuário. SIDRA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 23/01/2013.

IRLINGER, F. & MOUNIER, J. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20 n. 2, p. 142-148. 2009.

JARMOLOWSKA, B.; KOSTYRA, E.; KRAWCZUK, S.; KOSTYRA, H. β -Casomorphin-7 isolated from Brie cheese. **Jornal of the Science of Food Agriculture**, v.79, p. 1788-1792 1999.

KALIT, S.; LUKAC HAVRANEK, J.; KAPS, M.; PERKO, B.; CUBRIC CURIK, V. Proteolysis and the optimal ripening time of Tounj cheese. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 619–624. 2005.

KAMINARIDES, S. E.; ANIFANTAKIS, E. M. Comparative study of the separation of casein from bovine, ovine and caprine milks using HPLC. **Journal Dairy Reseach**. v.60, p.495-504, 1993.

KAROUI, R.; BOSSET, J. O.; MAZEROLLES, G.; KULMYRZAEV, A.; DUFOUR, E. Monitoring the geographic origin of both experimental French Jura hard cheeses and Swiss Gruyère and l'Etivaz PDO cheeses using mid-infrared and fluorescence spectroscopies. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 275–286, 2005.

KITTS, D. D.; WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 1309–1323. 2003.

Korhonen, H. J. Bioactive milk proteins and peptides: From science to functional applications. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 64, p. 16–25. 2009.

KORHONEN, H., & PIHLANTO, A. Bioactive peptides: New challenges and opportunities for the dairy industry. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 129–134. 2003c.

KORHONEN, H., & PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Novel applications for milk proteins. **Applied Biotechnology, Food Science and Policy**, v. 1, p. 133–144. 2003b.

KORHONEN, H., & PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16 n. 9, p.945–960. 2006.

KORHONEN, H., & PIHLANTO, A. Food-derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods. **Current Pharmaceutical Design**. v. 9, p. 1297–1308. 2003a.

KORHONEN, H.; PIHLANTO-LEPPALA, A. Milk-derived bioactive peptides: Formation and prospects for health promotion. In C. Shortt, & J. O'Brien (Eds.), Handbook of Functional Dairy Products. **Functional Foods and Nutraceuticals Series 6.0**, p. 109–124. 2004.

LÁCTEA BRASIL. **Queijo: alimento nobre e saudável**. Produção: Láctea Brasil. 16p. 2006.

LAEZZA, P.; NOTA, G.; ADDEO, F. Determination of bovine and ovine milk in mixtures by fast ion-exchange chromatography of whey protein. **Milchwissenschaft**, v.46, p.559- 561, 1991.

LARRAYOZ, P.; ADDIS, M.; GAUCH, R. BOSSET, J. O. Comparison of dynamic headspace and simultaneous distillation extraction techniques used for the analysis of the volatile components in three European PDO ewes' milk cheeses. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 911–926. 2001.

LATICINIO, **Queijo de Coalho**. Disponível em <<http://www.laticinio.net>>. Acesso em: 11/06/2013.

LAW, A.J.R.; PAPOFF, C.M.; DALGLEISH, D.G. et al. Quantitative fraction of ovine casein by cation-exchange FPLC. **Milchwissenschaft**, v.47, p.279-282., 1992.

LAW, A.J.R.; TZIBOULA, A. Quantitative fractionation of caprine casein by cation-exchange FPLC. **Milchwissenschaft**, v.47, p.558-562, 1992.

LÉONIL, J.; GAGNAIRE, V.; MOLLÉ, D.; PEZENNEC, S.; BOUHALLAB, S. Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of food proteins and derived peptides. **Journal Chromatography A**. v. 881, p. 1–21. 2000.

LÉONIL, J.; MOLLÉ, D.; GAUCHERON, F.; ARPINO, P. GUÉNOT, P.; MAUBOIS, J. L. Analysis of major bovine milk proteins by on-line high-performance liquid chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Lait**, v. 75, 193p. 1995.

LINDMARK-MANSSONA, H.; TIMGREN, A.; ALDE´N, G.; PAULSSON, M. Two-dimensional gel electrophoresis of proteins and peptides in bovine milk. **International Dairy Journal**, v.15, p. 111–121, 2005.

LUND, M.; ARDO, Y. Purification and identification of water soluble phosphopeptides from cheese using Fe(III) affinity chromatography and mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52 n. 21, p. 6616-6622. 2004.

MANNU, L.; COMUNIAN, R.; SCINTU, M. F.; Mesophilic lactobacilli in Fiore Sardo cheese: PCR-identification and evolution during cheese ripening. **International Dairy Journal**. v. 10, p. 383-389, 2000.

MANSO, M. A.; LE´ONIL, J. & GAGNAIRE, J. V. Application of proteomics to the characterization of milk and dairy products. **International Dairy Journal**. v. 15, p. 845–855, 2005.

MARKET, C. L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenic, and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 45, p. 753-763, 1959.

MARTINS, L. S. P. **Monitoramento da produção de cidos orgânicos em amostras de leite fermentado pelos gros de kerfir e do tiber técnicas voltamtrica e HPLC**. Tese, Universidade de São Paulo. São Carlos-SP, 31f, 2006.

MASOTTI, F.; HOGENBOOM, J. A.; ROSI, V.; DE NONI, I.; PELLEGRINO, L. Proteolysis indices related to cheese ripening and typicalness in PDO Grana Padano cheese. **International Dairy Journal**, v. 20, p.352-359. 2010.

MAYER, H. K. Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. **International Dairy Journal**. v. 15, p. 595-604. 2005.

MAYER, W.; HRTNER, H. "Discontinuous electrophoresis of β - caseins for the determination of bovine caseins in milk and dairy products", **Electrophoresis**, v. 13, p. 803-804. 1992.

MCSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal Dairy Technology**. v. 57, p. 127–144. 2004.

MEISEL, H. Bioactive peptides from milk proteins: A perspective for consumers and producers. **Australian Journal of Dairy Technology**. v. 56, p. 83–92. 2001

MEISEL, H. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. **BioFactors**, v. 21, p. 55–61. 2004

MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9 n. 16, p. 1289–1295. 2003.

MENEGHETI, G. Indicação Geográfica – Coalho com nome e sobrenome. **Revista Inforleite**, n. 2, São Paulo, 2010.

MICHAELIDOU, A.; ALICHANIDIS, E.; URLAUB, H.; POLYCHRONIADOU, A.; ZERFIRIDIS, G. K. Isolation and identification of some major water soluble peptides in Feta cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 81n. 12, p. 3109–3116. 1998.

MUCHNIK, J.; BIENABE, E.; CERDAN, C. Food identity/food quality: insights from the "coalho" cheese in the Northeast of Brazil. **Anthropology of Food**, v.4, p. 1-17, 2005.

NASSU, R. T.; ARAUJO, R. S.; GUEDES, C. G. M.; ROCHA, R. G. A. Diagnostico das condições de processamento e caracterização físico - química de queijos regionais e manteiga no Rio Grande do Norte. Fortaleza: Embrapa Agroindustria Tropical, 2003. 24p. (Embrapa Agroindustria Tropical. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 11).

NASSU, R. T.; ARAÚJO, R. S.; BORGES, M. F.; LIMA, J. R.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P.; BASTOS, M. S. R. Diagnóstico das condições de processamento de produtos regionais derivados do leite no Estado do Ceará. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 28p. (Embrapa Agroindústria Tropical. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 11).

NEBRICH, G.; HERRMANN, M.; HARTL, D.; DIEDRICH, M.; KREITLER, T.; WIERLING, C.; KLOSE, J.; GIAVALISCO, P.; ZABEL, C.; MAO, L. PROTEOMER: A workflow-optimized laboratory information management system for 2-D electrophoresis-centered proteomics. **Proteomics**, v.9, n.7, p.1795-1808, 2009.

NICOLAOU, N.; XU, Y.; GOODACRE, R. MALDI-MS and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. **Anal Bioanal Chem.** v. 399, p. 3491-3502. 2011.

NÓBREGA, M. B. de M.; SANTOS, R. C. dos; FREIRE, R. M. M.; CARVALHO, J. M. F. C. **Princípios e utilização da técnica de eletroforese em géis de amido e poliácridamida.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 104p. 2010.

O'DONNELL, R.; HOLLAND, J. W.; DEETH, H. C. & ALEWOOD, P. Milk proteomics. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 1013–1023, 2004.

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

ONG, L.; SHAH, N. P. Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. **LWT – Food Sci. Technol**, v. 41 p. 1555 – 1566. 2008.

PAIZS, B.; SUHAL, S. Fragmentation pathways of protonated peptides. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24 n. 4, p. 508-548. 2005.

PALUMBO, A. M.; SMITH, S. A.; KALCIC, C. L.; DANTUS, M.; STEMMER, P. M.; REID, G. E. Tandem mass spectrometry strategies for phosphoproteome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30 n. 4, p. 600-625. 2011.

PAPPA, E. C.; ROBERTSONA, J. A.; RIGBYA, N. M.; MELLONA, F.; KANDARAKISB, I.; MILLS, E. N. C. Application of proteomic techniques to protein and peptide profiling of Teleme cheese made from different types of Milk. **International Dairy Journal.** v. 18 n. 6, p. 605-614. 2008.

PARK, Y. W. Proteolysis and lipolysis of goat milk cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 84–92. 2001.

PAVIA, M., TRUJILLO, A. J., GUAMIS, B., & FERRAGUT, V. Proteolysis in Manchegotype cheese salted by brine vacuum impregnation. **Journal of Dairy Science**. v. 83, p. 1441–1447. 2000.

PELLEGRINO, L.; DE NONI, I.; TIRELLI, A. et al. Detection of cows' milk in non-bovine cheese by HPLC of whey proteins. Note 1: Application to water buffalo Mozzarella cheese. **Sci. Tec. Lattiero-Casearia**, v.42, p.87-101, 1991.

PERI, C.; GAETA, D. **Designations of origin and industry certification as means of valorising agricultural food products**. In: VINCI, S. (Coord.). The European agro-food system and the challenge of global competition. Roma: ISMEA. p. 59-68. 1999

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Quimica Nova**, v. 27, p. 293–300, 2004.

PIRAINO, P.; UPADHYAY, V. K.; ROSSANO, R.; RICCIO, P.; PARENTE, E.; KELLY, A. L.; MCSWEENEY, P. L. H. Use of mass spectrometry to characterize proteolysis in cheese. **Food Chemistry**. v. 101 n. 3, p. 964-972. 2007.

PIRES, E. F.; MORAIS, C. M. M.; SILVA, J. A.; CARVALHO, R. O. C. **Queijo de Coalho – Perfil Industrial**. Recife: SEBRAE/PE, v.1, p. 44, 1994.

PIRISI, A.; PIREDDA, G.; CORONA, M.; PES, M.; PINTUS, S.; LEDDA, A. **Influence of somatic cell count on ewe's milk composition, cheese yield and cheese quality**. 6th Great Lake Dairy Sheep Symposium, Guelph, Ontario, Canada, p. 2-4, 2000.

PISANU, S.; GHISAURAA, S.; PAGNOZZI, D.; FALCHI, G.; BIOSA, G.; TANCA, A.; ROGGIO, T.; UZZAU, S.; ADDIS, M. F. Characterization of sheep milk fat globule proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis/mass spectrometry and generation of a reference map. **International Dairy Journal**, v. 24, p. 78-86, 2012.

POVEDA, J. M.; SOUSA, M. J.; CABEZAS, L.; MCSWEENEY, P. L. H. Preliminary observations on proteolysis in Manchego cheese made with a defined-strain starter culture and adjunct starter (*Lactobacillus plantarum*) or a commercial starter. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 169–178, 2003.

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

QUEIROGA, R. de C. R. do E.; SANTOS, B. M.; GOMES, A. M. P.; MONTEIRO, M. J.; TEIXEIRA, S. M.; SOUZA, E. L.; PEREIRA, C. J. D. & PINTADO, M. M. E. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats, cows, milk and their mixture. **LWT - Food Science and Technology**. v. 50, n. 2, p. 538-544. 2013.

RABILLOUD, T. Mechanisms of protein silver staining in polyacrilamide gels: A 10-year synthesis. **Electrophoresis**. v.11, p.785-794, 1990.

RABILLOUD, T.; VUILLARD, L.; GILLY, C.; LAWRENCE, J.J. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. **Cellular and Molecular Biology**. v.40, p.57-75, 1994.

RAPINI, L. S.; TEIXEIRA, J. P.; MARTINS, N. E.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 56, p.130-133, 2004.

ROSEIRO, L. B.; GÓMEZ-RUIZ, J. A.; GARCÍA-RISCO, M.; MOLINA, E. Vegetable coagulant (*Cynara cardunculus*) use evidenced by capillary electrophoresis permits PDO Serpa cheese authentication. **Lait**. v. 83, p.343–350, 2003

SAITO, T.; NAKAMURA, T.; KITAZAWA, H.; KAWAI, Y; ITOH, T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1434-1440, 2000.

SANDRE, C.; GLEIZES, A.; FORESTIER, F.; GORGES-KERGOT, R.; CHILMONCZYK, S.; LEONIL, J.; MOREAU, M. C. & LABARRE, C. A peptide derived

from bovine β -casein modulates functional properties of bone marrow-derived macrophages from germfree and human flora-associated mice. **Journal of Nutrition**. v. 131, n. 11, p. 2936-2942. 2001.

SAS 9.2 - Estatistical Analysis Systems. Intitute Inc. 2009. OnlineDoc. 9.2. Cary, NC: SAS Intitute Inc.

SEBRAE. **Projeto melhoria da qualidade do queijo de coalho produzido no Ceará**. Fortaleza: SEBRAE/CE, 208p. 1998.

SEBRAE/ESPM. **Queijos Nacionais**. São Paulo: SEBRAE/ESPM, 34p. 2008.

SENA, M. J.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; MORAIS, C. F. A.; CORREA, E. S.; SOUZA, M. R. Características físico-químicas de queijo de coalho comercializado em Recife, PE. **Higiene Alimentar**. v. 14, n. 74, p. 41-44. 2000.

SENYUVA, H.; GILBERT, J.; OZCAN, S.; GUREL, N. World Mycotoxin Journal, 1, p. 229-235. 2008

SERTÃOBRAS. Fórum Internacional: Indicações Geográficas, Patrimônio Cultural e os Queijos de Leite Cru. Disponível em: <<http://www.sertaobras.org.br>>. Acesso em: 12/06/2013.

SFORZA, S.; AQUINO, G.; CAVATORTA, V.; GALAVERNA, G.; MUCCHETTI, G.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. Proteolytic oligopeptides as molecular markers for the presence of cows' milk in fresh cheeses derived from sheep milk. **International Dairy Journal**. v. 18, p. 1072-1076. 2008.

SFORZA, S.; FERRONI, L.; GALAVERNA, G.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. Extraction, semi-quantification, and fast on-line identification of oligopeptides in Grana Padano cheese by HPLC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 2130–2135. 2003.

SFORZA, S.; GALAVERNA, G.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R.; NEVIANI, E.; PINELLI, C. Study of the oligopeptide fraction in Grana Padano and Parmigiano Reggiano cheeses by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. **European Journal of Mass Spectrometry**. v. 10, p. 421-427. 2004.

SHIMIZU, M. Food-derived peptides and intestinal functions. **BioFactors**, v. 21, p. 43–47. 2004.

SIEBER, R.; BÜTIKOFER, U.; EGGER, C.; PORTMANN, R.; WALTHER, B.; WECHSLER, D. ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. **Dairy Science Technology**. v. 90, p. 47–73. 2010.

SILVA, M. C. D.; RAMOS, A. C. S.; MORENO, I.; MORAES, J. O. Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 69, p. 214-221. 2010.

SILVA, R. A.; LIMA, M. S.; VIANA, J. B.; BEZERRA, V. S.; PIMENTEL, M. C.; PORTO, A. L.; CAVALCANTI, M. T.; LIMA FILHO, J. L. Can artisanal "Coalho" cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? **Food Chemistry**. v. 135, p. 1533–1538. 2012.

SILVA, S. V.; MALCATA, F. X. Caseins as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 1, p. 1-15. 2005.

SINGH, T. K.; FOX, P. F.; HOJRUP, P.; HEALY, A. A scheme for the fractionation of cheese nitrogen and identification of principal peptides. **International Dairy Journal**. v. 4, p. 111–122. 1994.

SOERYAPRANATA, E.; POWERS, J.; FAJARRINI, F.; WELLER, K.; HILL, H.; SIEMS, W. Relationship between MALDI-TOF analysis of b-CN f193–209 concentration and sensory evaluation of bitterness intensity of aged Cheddar cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, n. 17, p. 4900-4905. 2002b.

SOERYAPRANATA, E.; POWERS, JR.; HILL, H. H.; SIEMS, W. F.; AL-SAAD, K.; WELLER, K. M. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry method for the quantification of b-casein fragment (f193–209). **Journal of Food Science**, v. 67, n. 2, p. 534–538. 2002a.

SOUSA, M. J.; ARDO, Y.; MCSWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**. v. 11, p. 327–345. 2001.

SOUZA FILHO, J. S., ARCANJO, H. G. S., LIMA LINO, F. R., OLIVEIRA, H. B., MATIAS, S. N. M., SILVA, J. J. P. **Avaliação dos Parâmetros Físico Químicos do Queijo “Coalho” Artesanal Produzido Calçado – Pe.** Anais do 50º Congresso Brasileiro de Química, Cuiabá-MT. 2010.

SGARBIERI, V. C. Revisão propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal Food Technology**, v.8, n. 1, p.43-56, 2005.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: Propriedades, degradações e modificações.** São Paulo, Varela, 1996.

SPERAT-CZAR, A. **Os queijos de leite cru.** Tradução de Vania Hermann, SertãoBras. 75p. 2012.

SPERS, E.E. **Decio Zylbersztajn; Andrea Bertrait; Decio Zylbersztajn; Ferenc Istvan Bánkuti. Dungullin state: certificação de qualidade na agricultura australiana.** Anais do SEMINÁRIO INTERNACIONAL PENSA DE AGRIBUS INESS, São Paulo: Programa de Estudos e dos Negócios do Sistema Agroindustrial, v. 9, São Paulo.1999.

STANCIUC, N.; RAPEANU, G. Identification of adulterated sheep and goat cheeses marketed in Romania by immunocromatographic assay. **Food and Agricultural Immunology**. v. 21, n. 2, p. 157-164. 2010.

STONE, H.; SIDEI, J. L.; OLIVER, S.; WOOSLEY, A.; SINGLETON, R. C. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. **Food Technology, Chicago**, v. 28, n. 11, p. 24-34, 1974.

STRANGE, E. D.; MALIN, E. L.; VAN HEKKEN, D. L.; BASCH, J. J. "Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins", **Journal Chromatography A**. v. 624, p. 81-102. 1992.

STRYER, L. **Bioquímica.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan SA, 1992.

SUCKAU, D.; RESEMANN, A.; SCUERENBERG, M.; HUFNAGEL, P.; FRANZEN, J.; HOLLE, A. A New MALDI LIFT TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n.7, p. 952-965. 2003.

TELLEZ, A.; CORREDIG, M.; BROVKO, L. Y.; GRIFFITHS, M. W. Characterization of immuneactive peptides obtained from milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. **J Dairy Res**, v. 77, p. 129-136. 2010.

TONOUCHI, H.; SUZUKI, M.; UCHIDA, M.; ODA, M. Antihypertensive effect of an angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from enzyme modified cheese. **Journal of Dairy Research**. v. 75, p. 284–290. 2008.

TRUJILLO, A. J.; CASALS, I.; GUAMIS, B. Analysis of major ovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography and flow injection analysis with electrospray ionization mass spectrometry. **Journal Chromatography A**. v. 870, p. 371-380. 2000

TRUJILLO, A.J.; GUAMIS, B.; CARRETERO, C. Proteolysis of goat β -casein by calf rennet. **International Dairy Journal**, v.7 p. 579–588, 1997.

URBANKE, W.; LUF, W.; BRANDL, E. "Use of HPLC for control of the adulteration of milk and milk products of different species", **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 195, p. 137-142. 1992.

VELOSO, A. C. A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I. M., FERREIRA, M. A. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova** , v.25, n.4, p. 609-615, 2002.

VERDIER-METZ, I.; COULON, J. B.; PRADEL, P.; VIALON, C.; ALBOUY, H.; BERDAGUÉ, J-L. Effect of the botanical composition of hay and casein genetic variants on the chemical and sensory characteristics of ripened Saint-Nectaire type cheeses. **Lait**. v. 80, p. 361-370. 2000.

VERDINI, R. A.; ZORRILLA, S. E.; RUBIOLLO, A.C. Characterisation of soft cheese proteolysis by RP-HPLC analysis of its nitrogenous fractions. Effect of ripening time and sampling zone. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 445–454, 2004.

VISSER, S.; SLAGEN, C.J.; LAGERWERF, F.M.; VANDONGEN, W.D.; HAVERKAMP J. "Identification of a new genetic variant of bovine beta-casein using reversed-phase high-performance liquid-chromatography and mass-spectrometric analysis". **Journal Chromatography A**. v. 711, p. 141-150. 1995.

VOIRIN, A.; LETAVERNIER, J. F.; SEBILLE, B. Improvement of extraction and concentration of milk peptides with solid-phase cartridges for analysis by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 553, p. 155-164. 1991.

WEBER, K.; OSBORN, M. Proteins and sodium dodecyl sulfate: molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures. In: WEBER, K. **The proteins**. New York: Academic Press, v.1, p. 179-233, 1975.

YAMAMOTO, N.; AKINO, A.; TAKANO, T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 4, p.917-922. 1994.

APÊNDICES

APÊNDICE A – FICHA APLICADA NAS QUEIJARIAS PARA DIAGNÓSTICO DA PRODUÇÃO

DIAGNÓSTICO DA ATIVIDADE DE PRODUÇÃO DE QUEIJO

PRODUTOR: _____
APELIDO: _____
CPF: _____ **RG:** _____
NOME DO EMPREENDIMENTO: _____
ENDEREÇO: _____

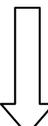
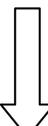
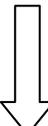
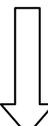
TELEFONE: _____
SIE: _____

1. Número de funcionários
 - 1.1 Números de funcionários na ordenha _____
 - 1.2 Números de funcionários na fábrica _____
2. Fornecimento de Leite
 - 2.1 Número de Fornecedores de Leite _____
 - 2.1.1. Quantidade litros/queijo beneficiadas terceiros por dia _____
 - 2.2 Quantidade litros/queijo beneficiadas próprio por dia _____
 - 2.2.1. Número do rebanho _____
 - 2.2.2 Número vacas em lactação _____
 - 2.2.3 Média de produção litros por vaca _____
 - 2.2.3.1. Alimentação animais inverno _____
 - 2.2.3.1. Alimentação animais verão _____
3. Canal de Comercialização
 - 3.1. Comercialização direta _____
 - 3.2. Comercialização intermediários _____
 - 3.3. Destino da produção _____
4. Dados de rentabilidade
 - 4.1 Preço do leite (L) _____
 - 4.2. Preço do queijo (Kg) _____
 - 4.3 Faturamento semanal _____
 - 4.4 Lucro líquido _____
5. Tem outra atividade _____

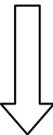
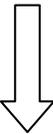
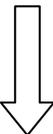
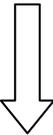
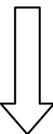
Local _____ Data _____

x _____
 Assinatura Produtor

APÊNDICE A – FICHA APLICADA NAS QUEIJARIAS PARA DIAGNÓSTICO DA PRODUÇÃO (CONTINUAÇÃO)

Filtra: Currau <input type="checkbox"/> Plataforma <input type="checkbox"/> Horário: Ordenha: Plataforma: Leite: Quant: Nº Fornecedores: Origem do Leite: Controle sanitário do rebanho:	RECEPÇÃO	Transporte: Carro <input type="checkbox"/> Moto <input type="checkbox"/> Carroça <input type="checkbox"/> Tambor: Aço <input type="checkbox"/> Plástico <input type="checkbox"/> Alumínio <input type="checkbox"/> Ordenha: Mecânica <input type="checkbox"/> Manual <input type="checkbox"/> Higiene: Mãos <input type="checkbox"/> Tetas <input type="checkbox"/> Tambor <input type="checkbox"/>
		
Tanque: Inox <input type="checkbox"/> Plástico <input type="checkbox"/> Capacidade: Cloreto de cálcio: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Quantidade:	COAGULAÇÃO	Coalho: Pó <input type="checkbox"/> Líquido <input type="checkbox"/> Animal <input type="checkbox"/> Tempo de coagulação: Quantidade de coalho:
		
Corte: Lira <input type="checkbox"/> Faca <input type="checkbox"/> Mãos <input type="checkbox"/> Ponto de corte:	CORTE DA COALHADA	
		
Quantas vezes mexe: Rápido <input type="checkbox"/> Devagar <input type="checkbox"/> Tempo entre as mexeduras: Mexe com: Temperatura:	MEXEDURA	
		
Quantidade retirada: Retira quantas vezes: Destino do soro:	DESSORAGEM	
		
Tempo de cozimento: Temperatura: Aquece: Soro <input type="checkbox"/> Água <input type="checkbox"/> Soro + Água <input type="checkbox"/>	COZIMENTO	Como aquece: Procedência da água: SAAE <input type="checkbox"/> Poço <input type="checkbox"/> Açude <input type="checkbox"/> Rio <input type="checkbox"/>
		

APÊNDICE A – FICHA APLICADA NAS QUEIJARIAS PARA DIAGNÓSTICO DA PRODUÇÃO (CONTINUAÇÃO)

Direto na massa <input type="checkbox"/> Salmoura <input type="checkbox"/> Quantidade de sal: _____ _____ _____	SALGA 	_____ _____ _____ _____ _____
Prensa: Inox <input type="checkbox"/> Madeira <input type="checkbox"/> Forma: Redonda <input type="checkbox"/> Quadrada <input type="checkbox"/> Plástica <input type="checkbox"/> Madeira <input type="checkbox"/> _____ _____	PRENSAGEM 	Tempo de prensagem: _____ Peso: _____ Tempo de virada: _____ _____
Tempo: _____ Temperatura: _____ Local: _____ _____	MATURAÇÃO 	_____ _____ _____ _____ _____
Embala: Saco plástico <input type="checkbox"/> Sacola <input type="checkbox"/> Vácuo <input type="checkbox"/> Rotula: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> _____ _____ _____	EMBALAGEM 	_____ _____ _____ _____ _____
Armazena: Câmara frigorífica <input type="checkbox"/> Freezer <input type="checkbox"/> Temperatura: _____ _____ _____	ARMAZENAMENTO 	_____ _____ _____ _____ _____
Locais: Transporte: Forma de pagamento: _____ _____ _____	COMERCIALIZAÇÃO 	_____ _____ _____ _____ _____

APÊNDICE B – FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL

CODIGO AMOSTRA:

DATA :
NOME PROVADOR:

PARA CADA ATRIBUTO, APRECIAR A INTENSIDADE DOS PARAMETROS ESTABELECIDOS PARA O QUEIJO COALHO DO JAGUARIBE - CE

ASPECTO GLOBAL

		1	2	3	4	5	6	7		observação
FORMA	anormal	<input type="checkbox"/>	redondo	_____						
TAMANHO / PESO	anormal	<input type="checkbox"/>	adequado	_____						
COR	anormal	<input type="checkbox"/>	amarelo claro c/ tolerância de manchas + claras	_____						
PARTE SUPERIOR	marcado	<input type="checkbox"/>	liso	_____						
LATERAL	anguloso	<input type="checkbox"/>	reta	_____						
BORDAS SUPERIOR	quina	<input type="checkbox"/>	arredondada	_____						
BORDAS INFERIOR	deformada	<input type="checkbox"/>	reta	_____						
UMIDADE EXTERNA	decolorado	<input type="checkbox"/>	leve umidade	_____						
TEXTURA	anormal	<input type="checkbox"/>	flexível / Uniforme	_____						

ASPECTO PÓS CORTE

		1	2	3	4	5	6	7		observação
MASSA	olhaduras / aberturas	<input type="checkbox"/>	lisa / algumas olhaduras	_____						

ODOR / CHEIRO

ACIDO	forte	<input type="checkbox"/>	agradável / suave	_____						
LEITE / MANTEIGA	fraco / forte	<input type="checkbox"/>	agradável	_____						

CONSISTÊNCIA (NA BOCA)

FIRMEZA	duro / esfarelhado	<input type="checkbox"/>	macio c/ leve rangido	_____						
---------	--------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	-----------------------	-------

SABOR

SALGADO	insosso / salgado	<input type="checkbox"/>	levemente salgado	_____						
ACIDO	forte	<input type="checkbox"/>	leve / agradável	_____						
COALHADA / LEITE COZIDO	desagradável	<input type="checkbox"/>	agradável	_____						