ProDOP Serra da Estrela

Proteção, Promoção e Potencialização do Queijo Serra da Estrela DOP

Entregável 1.2

Relatório Técnico: Marcadores moleculares e metodologias desenvolvidas para identificação e rastreio de origem animal de leite em amostras de queijo na produção de queijo da Serra da Estrela DOP

Parceiros envolvidos na tarefa 1.2	Universidade do Minho (responsável), em parceria com a BLC3
Data de Início da Tarefa 1.2	01 de abril de 2019
Data de Conclusão da Tarefa 1.2	31 de dezembro de 2021

Índice

Índice de Figuras 3

Índice de Tabelas 5

Introdução 8

Execução da tarefa 11

Ensaios genéticos 11

Espectrometria de Emissão Atómica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES, do inglês, *Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*) 14

Ensaios químicos 19

Análise do perfil de aminoácidos em Queijo Serra da Estrela 50

Análise do perfil de gordura no queijo Serra da Estrela 56

Bibliografia 58

Índice de Figuras

Figura 1. Gel de agarose 1,5 % da análise por RAPD a partir de amostras de queijos de diferentes produtores da região da Serra da Estrela utilizando o *primer* GLA-19. Para esta análise foi utilizado o DNA proveniente da extração com fenol-clorofórmio. MM, marcador molecular; C-, controlo negativo; 1, queijo ovelha curado Alvoco (AL); 2, queijo ovelha curado Queijaria dos Lobos (QL); 3, queijo ovelha curado Queijos Fraga (FR); 4, queijo Serra da Estrela (SE; DOP); 5, queijo ovelha curado Paulo Rogério (PR)..... 13

Figura 2. Gel de agarose 1,5 % da análise por SCAR a partir de amostras de queijos de diferentes produtores da região da Serra da Estrela, utilizando os *primers* CR-GLA-19_Fw e CR-GLA-19_Rv. Para esta análise foi utilizado o DNA proveniente da extração com fenol-clorofórmio. MM, marcador molecular; C-, controlo negativo; 1, queijo ovelha curado Alvoco (AL); 2, queijo ovelha curado Queijaria dos Lobos (QL); 3, queijo ovelha curado Queijos Fraga (FR); 4, queijo Serra da Estrela (SE; DOP); 5, queijo ovelha curado Paulo Rogério (PR)..... 13

Figura 3. Espectro de infravermelho de amostra QOC1 (Queijo de ovelha curado). Azul-Região I; rosa Região II; verde- Região III..... 29

Figura 4. Comparação das amostras: queijo de ovelha curado (azul) *vs.* queijo de mistura (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III. 30

Figura 5. Comparação das amostras: queijo de vaca (azul) *vs.* queijo ovelha (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III..... 31

Figura 6. Comparação das amostras: queijo de ovelha curado (azul) *vs.* queijo cabra (preto).. 32

Figura 7. Queijos de ovelha curado da região da Serra da Estrela. a) queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério; b) queijo de ovelha curado da Queijaria dos Lobos; c) Queijo Serra da Estrela DOP da empresa Vale da Estrela; d) queijo de ovelha curado da empresa Maratona de Delícias. 33

Figura 8. Determinação da percentagem de gordura em amostras de queijo de Serra da Estrela DOP..... 34

Figura 9. Determinação do teor de cinzas em amostras de queijo Serra da Estrela DOP. 36

Figura 10. Espectro de infravermelho de amostra DOP1 (queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP (empresa Vale de Estrela). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.... 40

Figura 11. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela (azul) *vs.* queijo da queijaria artesanal Paulo Rogério (preto) Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III. 41

Figura 12. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela (azul) *vs*. queijo queijaria dos Lobos (preto). Azul-Região I; rosa-Região II; verde- Região III. 42

Figura 13. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela (azul) *vs*. queijo da empresa Maratona de Delícias de Alvoco das Várzeas (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III. 43

Figura 14. Comparação das amostras: Queijo Serra da Estrela DOP (azul); Queijo de ovelha curado (queijaria artesanal Paulo Rogério) (rosa); Queijo de ovelha curado (queijaria dos Lobos) (amarelo); Queijo de ovelha curado (empresa Maratona Delícias, Alvoco das Várzeas) (vermelho). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III. 44

Figura 15. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela (azul) *vs.* queijo de mistura produzido através de leite de ovelha, cabra e vaca (Continente, SONAE) (preto) Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III. 45

Figura 16. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela (azul) *vs.* queijo de vaca (Queijos Tavares, S.A., região Seia) (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III. 47

Figura 17. Comparação das amostras: ovelha Serra da Estrela de certificação DOP (azul) *vs.* queijo cabra (preto). 48

Figura 18. Comparação das amostras: ovelha Serra da Estrela de certificação DOP (azul) *vs.* queijo de ovelha desta região não DOP (Queijos Tavares, S.A., região de Seia) (preto). 49

Índice de Tabelas

Tabela 1. Soluções usadas na extração de DNA de queijo através do método fenol-clorofórmio modificado 12

Tabela 2. Elementos analisados por ICP-OES e respetivo comprimento de onda 14

Tabela 3. Procedimento de temperatura aplicado no digestor 15

Tabela 4. Quantificação (em mg /Kg de peso fresco) de minerais em diferentes queijos DOP da região da Serra da Estrela e um queijo não DOP. Os valores apresentados indicam a média de duas réplicas independentes e o respetivo desvio padrão. A ANOVA de uma via realizada foi feita comparando os valores obtidos para cada queijo de ovelha DOP com o queijo de ovelha não DOP (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001) 18

Tabela 5. Condições de teste para analisar a textura de amostras de queijo 21

Tabela 6. Resultados dos ensaios para determinação da gordura em queijos de ovelha curado, vaca amanteigado, cabra curado e mistura (leite de ovelha, vaca e cabra) 22

Tabela 7. Resultado do ensaio para determinação da humidade em queijos de ovelha curado, vaca amanteigado, cabra curado e mistura (mistura de leites de ovelha, vaca e cabra) 23

Tabela 8. Resultados do ensaio para determinação das cinzas em queijos de ovelha curado, vaca amanteigado, cabra curado e mistura (mistura de leites de ovelha, vaca e cabra) 24

Tabela 9. Resultados dos ensaios para determinação da atividade da água (a_w) em queijos de ovelha curado, vaca amanteigado, cabra curado e mistura (mistura de leites de ovelha, vaca e cabra) 24

Tabela 10. Resultados do ensaio para determinação do pH em queijos de ovelha curado, vaca amanteigado, cabra curado e mistura (mistura de leites de ovelha, vaca e cabra). 25

Tabela 11. Resultados do ensaio para determinação da percentagem de acidez titulável em queijos de ovelha curado, vaca amanteigado, cabra curado e mistura (mistura de leites de ovelha, vaca e cabra)..... 26

Tabela 12. Resultados do ensaio para a análise da textura em queijos de ovelha curado, vaca amanteigado, cabra curado e mistura (mistura de leites de ovelha, vaca e cabra) 27

Tabela 13. Comparação das amostras: queijo de ovelha curado *vs.* queijo de mistura, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1]..... 30

Tabela 14. Comparação das amostras: queijo de ovelha curado *vs.* queijo de vaca, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1]..... 31

Tabela 15. Comparação das amostras: queijo de ovelha curado *vs.* queijo de cabra, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1]..... 32

Tabela 16. Resultados dos ensaios para determinação da gordura em queijos de ovelha curado: queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR), queijo de ovelha curado da Queijaria dos Lobos (QL), Queijo Serra da Estrela DOP da empresa Vale da Estrela (DOP) e queijo de ovelha curado da empresa Maratona de Delícias (QAL)..... 34

Tabela 17. Resultados dos ensaios para determinação da humidade em queijos de ovelha curado: queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR), queijo de ovelha curado da Queijaria dos Lobos (QL), Queijo Serra da Estrela DOP da empresa Vale da Estrela (DOP) e queijo de ovelha curado da empresa Maratona de Delícias (QAL) 35

Tabela 18. Resultados dos ensaios para determinação das cinzas em queijos de ovelha curado: queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR), queijo de ovelha curado da Queijaria dos Lobos (QL), Queijo Serra da Estrela DOP da empresa Vale da Estrela (DOP) e queijo de ovelha curado da empresa Maratona de Delícias (QAL)..... 36

Tabela 19. Resultados dos ensaios para determinação da atividade de água em queijos de ovelha curado: queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR), queijo de ovelha curado da Queijaria dos Lobos (QL), Queijo Serra da Estrela DOP da empresa Vale da Estrela (DOP) e queijo de ovelha curado da empresa Maratona de Delícias (QAL) 37

Tabela 20. Resultados dos ensaios para determinação do pH em queijos de ovelha curado: queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR), queijo de ovelha curado da Queijaria dos Lobos (QL), Queijo Serra da Estrela DOP da empresa Vale da Estrela (DOP) e queijo de ovelha curado da empresa Maratona de Delícias (QAL)..... 37

Tabela 21. Resultados dos ensaios para determinação da acidez titulável em queijos de ovelha curado: queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR), queijo de ovelha curado da Queijaria dos Lobos (QL), Queijo Serra da Estrela DOP da empresa Vale da Estrela (DOP) e queijo de ovelha curado da empresa Maratona de Delícias (QAL) 38

Tabela 22. Resultados dos ensaios para a análise da textura em queijos de ovelha curado: queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR), queijo de ovelha curado da Queijaria dos Lobos (QL), Queijo Serra da Estrela DOP da empresa Vale da Estrela (DOP) e

queijo de ovelha curado da empresa Maratona de Delícias (QAL), usando as condições indicada anteriormente 39

Tabela 23. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs*. queijo da queijaria artesanal Paulo Rogério, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III (Woodcock *et al*., 2008) 41

Tabela 24. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs*. queijo da queijaria dos Lobos, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III (Woodcock *et al*., 2008) 42

Tabela 25. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs*. queijo da empresa Maratona de Delícias de Alvoco das Várzeas, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III (Woodcock *et al*., 2008)[1] 43

Tabela 26. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs.* queijo de mistura (Continente, SONAE), em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al*., 2008) 46

Tabela 27. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs.* queijo de vaca (Queijos Tavares, S.A., região Seia), em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al*., 2008) 47

Tabela 28. Comparação das amostras: ovelha Serra da Estrela de certificação DOP *vs.* queijo de cabra, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al*., 2008) 48

Tabela 29. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs*. queijo de ovelha desta região (Queijos Tavares, S.A., região de Seia) sem certificação DOP, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al*., 2008) 49

Tabela 30. Resumo dos aminoácidos livres identificados por diferentes autores..... 51

Tabela 31. Resumo dos ácidos gordos identificados por diferentes autores 57

Introdução

Nos últimos anos, o aumento de consciência por parte dos consumidores em relação à composição e processamento dos alimentos resultou numa necessidade de controlar as declarações de rotulagem. A rotulagem incorreta de alimentos representa fraude comercial. É importante estabelecer que espécies de elevado valor comercial não sejam substituídas, parcialmente ou na íntegra, por outras de menor valor. A avaliação de autenticidade de produtos lácteos é uma questão importante no que diz respeito aos interesses do consumidor, não apenas de um ponto de vista económico, mas também relativamente a necessidades médicas, alergias alimentares ou práticas religiosas. As adulterações mais comuns na indústria dos laticínios são a substituição de leite de elevado valor por leite de vaca não declarado ou a ausência de leite de espécies declaradas. Desta forma, a identificação da origem do leite é um fator muito importante no fabrico de queijo, especialmente de queijos produzidos a partir de uma espécie pura ou daqueles com Denominação de Origem Protegida (DOP). Além disso, alguns queijos são produzidos com quantidades definidas de cada tipo de leite (Borková & Snášelová, 2005; Golinelli *et al*., 2014; Zarei *et al*., 2016). A DOP foi definida pela Comissão Europeia em 2013 como sendo uma designação que cobre produtos agrícolas ou géneros alimentícios produzidos, processados e preparados numa área geográfica específica, usando um conhecimento de processo reconhecido (Dias & Mendes, 2018).

Os métodos analíticos utilizados para a identificação de espécies e autenticação de alimentos dependem principalmente da análise de proteínas e DNA. Os métodos baseados na análise de proteínas incluem ensaios imunológicos (Costa *et al*., 2008; Dvorak *et al*., 2016) e técnicas eletroforéticas e cromatográficas (Ferreira & Caçote, 2003; Mayer, 2005). Mais recentemente, as moléculas de DNA têm sido alvo para a identificação de espécies em alimentos devido à sua elevada estabilidade em comparação com proteínas e também devido à sua presença na maioria dos tecidos biológicos (Pascoal *et al*., 2005). A maioria dos métodos baseados em DNA para a identificação de espécies em alimentos consiste na amplificação específica de um ou mais fragmentos de DNA por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta técnica apresenta um alto potencial devido à sua rapidez, simplicidade, sensibilidade e especificidade. A amplificação por PCR baseia-se na hibridação de oligonucleótidos específicos (*primers*) e síntese *in vitro* de milhões de cópias flanqueadas por estes *primers* (Bintsis *et al*., 2008). A amplificação específica de um fragmento seguida por eletroforese em gel de agarose para verificar o tamanho do fragmento é a estratégia mais simples de PCR para avaliar a presença de uma espécie. Os métodos de confirmação adicionais

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

e/ou análise de fragmentos podem ser realizados por digestão dos fragmentos com endonucleases de restrição (PCR-RFLP) (Abdel-Rahman & Ahmed, 2007), técnicas de sequenciação de fragmentos (NGS) (Ribani *et al*., 2018), amplificação simultânea de dois ou mais fragmentos com diferentes pares de *primers* (multiplex PCR) (Bottero *et al*., 2003; Cottenet *et al*., 2011; De *et al*., 2011; Rentsch *et al*., 2013), e análise de conformação polimórfica de cadeia simples (PCR-SSCP) (Csikos *et al*., 2016). Esta última técnica baseia-se na mobilidade em eletroforese dos fragmentos amplificados em cadeia simples e na sua conformação. Outras estratégias utilizadas para a identificação de espécies em alimentos incluem a análise de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) (Cunha & Domingues, 2017), o qual envolve a utilização de *primers* arbitrários únicos e curtos, e a análise de Sequências Simples Repetidas (SSR), também conhecidas como microssatélites.

Desde que Lipkin *et al.* (1993) verificaram que as células somáticas presentes no leite podem ser utilizadas como fonte de DNA, vários métodos de PCR foram desenvolvidos para avaliação da autenticidade de produtos lácteos, permitindo a identificação de diferentes origens (vaca, cabra, ovelha e búfalo) (López-Calleja *et al*., 2005; Guo *et al*., 2018). Devido ao facto de DNA amplificável poder ser obtido a partir de leites sujeitos a tratamento térmicos, tais como, leite pasteurizado, ultra-pasteurizado e em pó (Miloradovic *et al*., 2018), é possível detetar por técnicas de PCR adulterações em queijos por substituição parcial ou total de leite de espécies não declaradas. Apesar de terem já sido desenvolvidos vários métodos de PCR para autenticação de produtos lácteos, estes focam-se na diferenciação inter-espécie, sendo que a diferenciação intra-espécie continua a ser um desafio. Neste sentido, o uso de ferramentas bioinformáticas que permitam identificar marcadores moleculares que poderão ser usados na diferenciação intra-espécie tem-se tornado cada vez mais importante.

O estudo do conteúdo mineral em amostras de leite e seus derivados tem-se mostrado relevante, pois permite obter informações acerca dos nutrientes e dos seus benefícios para a saúde ou ainda identificar possíveis marcadores de qualidade para a proteção e avaliação de determinados produtos (Lante *et al*., 2006). Além disso, têm sido desenvolvidos estudos na tentativa de relacionar a alimentação animal, as condições ambientais e o processo de fabrico com a distribuição dos elementos químicos em queijos (Coni *et al*., 1996; Levkov *et al*., 2017). A técnica analítica de Espectrometria de Emissão Atómica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES, do inglês, *Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*) tem sido usada para a quantificação de elementos em amostras de queijos de vaca e ovelha (Lante *et al*., 2006; Kira & Maihara, 2007; González-Martín *et al*., 2009; Bakircioglu *et al*., 2011;

Schoenfuss *et al*., 2014; Manuelian *et al*., 2017). Esta técnica baseia-se no pressuposto de que átomos e iões conseguem absorver energia e, deste modo, permitir que os eletrões passem do estado fundamental a um estado excitado. No caso do ICP-OES, a energia gerada que causa excitação nos eletrões provém do calor gerado num plasma de Árgon. A deteção é feita quando os átomos excitados perdem energia e transitam para um estado de energia mais baixo, emitindo luz a um comprimento de onda específico, sendo que a quantidade de luz que é libertada é proporcional ao número de átomos. Por fim, através da aplicação da Lei de Beer-Lambert é possível calcular a concentração de um dado elemento (Boss & Fredeen, 2004).

Os objetivos desta tarefa na Iniciativa ProDop incluiram a aplicação de metodologias genéticas para identificar os marcadores moleculares em amostras de queijos, de modo a conseguir diferenciar um queijo Serra da Estrela genuíno de um adulterado. Neste sentido, foram realizadas análises com amostras de queijo Serra da Estrela genuíno e adulterado, bem como amostras de queijo de outras origens (em particular, de cabra e vaca). É de referir que se realizou uma análise de caraterização do conteúdo mineral de queijos de diferentes produtores da região da Serra da Estrela no fim do período normal de maturação por ICP-OES, com o objetivo de avaliar a viabilidade desta técnica para relacionar a origem de queijos DOP com o seu conteúdo mineral.

Execução da tarefa

Para a execução da tarefa 1.2 da Iniciativa ProDop a UM teve um papel principal e fundamental no que respeita à identificação dos marcadores moleculares e otimização para utilização em amostras de queijo. Após a identificação dos *primers* específicos de cada raça em amostras de leite, a UM aplicou as mesmas metodologias da tarefa 1.1 nas amostras de queijo, otimizando as técnicas para a sua aplicação em amostras de queijo. Adicionalmente, a BLC3 efetuou, em paralelo, ensaios complementares para averiguar as variáveis de qualidade que distinguem um queijo da Serra da Estrela DOP de outro queijo. Neste sentido, os ensaios complementares realizados foram: atividade de água, pH, acidez titulável, gordura, textura e FTIR. Além da determinação de parâmetros de qualidade do queijo também se fez uma pesquisa exaustiva na literatura técnico-científica, ao nível do perfil de aminoácidos e gorduras. Esta investigação servirá para num futuro próximo desenvolver técnicas de determinação de aminoácidos e gorduras que distingam facilmente o queijo da Serra da Estrela DOP genuíno dos adulterados.

- ***Ensaios genéticos***

Amostras de queijo

Diferentes amostras de queijos foram fornecidas pela BLC3, incluindo queijo de vaca (QV), queijo Serra da Estrela (SE), queijo ovelha curado Queijos Fraga (FR), queijo ovelha curado Alvoco (AL), queijo ovelha curado Queijaria dos Lobos (QL) e queijo ovelha curado Paulo Rogério (PR).

Análise molecular de DNA

Métodos de extração de DNA de amostras de queijo

O método usado para extrair DNA a partir de amostras de queijo foi o mesmo que foi utilizado no âmbito da tarefa 1.1., para a extração de DNA a partir de amostras de leite: método fenol-clorofórmio modificado, realizado de acordo com Cunha *et al*. (2016). A extração de DNA de queijo foi iniciada por homogeneização de 0,2 g de amostra em 1 mL de água ultra-pura. Foram adicionados ao homogeneizado ou a 1 mL de leite 0,5 mL da solução clarificante (**Tabela 1**). A amostra foi misturada por inversão (10 vezes) e centrifugada a 13000 rpm numa microcentrífuga durante 5 min. O resultado foi um *pellet* de células e um sobrenadante transparente coberto por uma camada de gordura. O sobrenadante e a camada superior foram

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

cuidadosamente removidos, e o *pellet* de células foi ressuspendido em 860 µL de tampão de extração (**Tabela 1**), 100 µL de hidrocloreto de guanidina 5 M e 20 µl de Proteinase K 20 mg/mL. As amostras foram incubadas durante a noite a 55 °C, e arrefecidas à temperatura ambiente. Foram adicionados 500 µL de fenol-clorofórmio-isoamilalcool (25:24:1) (AppliChem) ao lisado, seguido de centrifugação a 13000 rpm durante 15 min. Foi obtido um sobrenadante aquoso transparente (500 µL), do qual foi precipitado o DNA por adição de 1 mL de álcool absoluto gelado, seguida de centrifugação a 13000 rpm durante 30 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* deixado a secar. O DNA foi ressuspendido em 30 µL de água ultra-pura, e a concentração determinada utilizando um espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

Tabela 1. Soluções usadas na extração de DNA de queijo através do método fenol-clorofórmio modificado

Solução clarificante	Tampão de extração
0,25 M EDTA pH 8.0 0,5 % Triton X-100	10 mM Tris-HCl pH 7.5 150 NaCl 2mM EDTA pH 8.0 1% SDS

Procedeu-se ainda à amplificação usando o primer RAPD GLA-19 em amostras de queijos de diferentes produtores da região da Serra da Estrela (**Figura 1**), pois foi importante avaliar a eficácia de deteção de adulteração contendo leite da raça 'Mocha' em amostras de queijo, e, desta forma, ser possível identificar amostras de queijos contendo leite de raças adulterantes.

Analisando os resultados obtidos em relação à amplificação, não se verificou a presença da banda de 350 pb caraterística da raça 'Mocha', indicando que estes queijos poderão conter apenas leite da raça 'Bordaleira Serra da Estrela' (**Figura 1**). A falta/incerteza da informação acerca da produção dos queijos testados (veracidade da sua não adulteração, raça de origem do leite utilizado para a adulteração, p.e.) e a dificuldade em obtê-la não permite averiguar a capacidade dos *primers* desenvolvidos para detetarem a utilização de leite da raça 'Mocha' em amostras de queijos DOP. Para obter esta confirmação, seria necessário produzir queijos em laboratório de modo a ter-se total conhecimento da sua composição em termos da origem do leite.

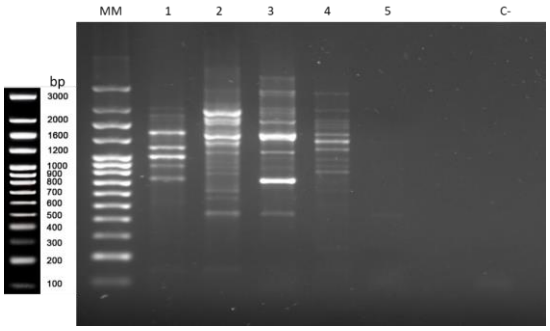

Figura 1. Gel de agarose 1,5 % da análise por RAPD a partir de amostras de queijos de diferentes produtores da região da Serra da Estrela utilizando o *primer* GLA-19. Para esta análise foi utilizado o DNA proveniente da extração com fenol-clorofórmio. MM, marcador molecular; C-, controlo negativo; 1, queijo ovelha curado Alvoco (AL); 2, queijo ovelha curado Queijaria dos Lobos (QL); 3, queijo ovelha curado Queijos Fraga (FR); 4, queijo Serra da Estrela (SE; DOP); 5, queijo ovelha curado Paulo Rogério (PR).

As amostras de DNA extraído das diferentes amostras de queijos foram ainda amplificadas usando os *primers* SCAR CR-GLA19 usados anteriormente para amplificar DNA extraído de amostras de leite (**Figura 2**).

Pela análise SCAR verificou-se a amplificação de uma banda ténue com cerca de 244 pb para as amostras de DNA extraídas dos queijos Alvoco, Queijaria dos Lobos e queijo Serra da Estrela (**Figura 2**). Apesar das bandas serem ténues, este resultado desperta dúvidas em relação à composição dos queijos. Além disso, a deteção de uma banda com cerca de 350 pb em 3 das 5 amostras de queijos testadas (Queijo Alvoco, Queijaria dos Lobos e Paulo Rogério) poderá ser uma banda a analisar (sequenciação), pois poderá até ser específica da raça 'Bordaleira Serra da Estrela'. No entanto, este resultado teria de ser confirmado analisando maior quantidade de queijos cuja composição fosse totalmente conhecida.

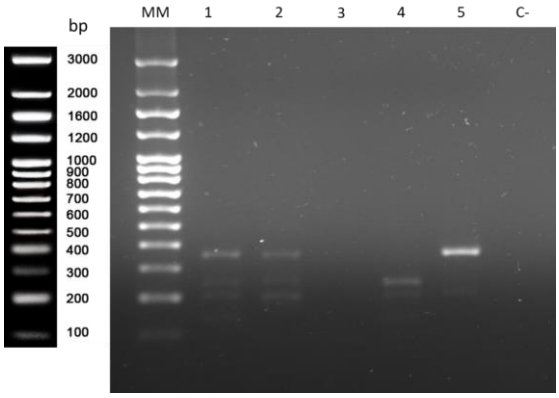

Figura 2. Gel de agarose 1,5 % da análise por SCAR a partir de amostras de queijos de diferentes produtores da região da Serra da Estrela, utilizando os *primers* CR-GLA-19_Fw e CR-GLA-19_Rv. Para esta análise foi utilizado o DNA proveniente da extração com fenol-clorofórmio. MM, marcador molecular; C-, controlo negativo; 1, queijo ovelha curado Alvoco (AL); 2, queijo ovelha curado Queijaria dos Lobos (QL); 3, queijo ovelha curado Queijos Fraga (FR); 4, queijo Serra da Estrela (SE; DOP); 5, queijo ovelha curado Paulo Rogério (PR).

- ***Espectrometria de Emissão Atómica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES, do inglês, Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry)***

Instrumentação

O ICP-OES da marca PERKIN ELMER, modelo OPTIMA 8000, foi usado neste trabalho para determinar o conteúdo mineral em amostras de queijos de diferentes produtores da região da Serra da Estrela e um queijo não DOP, de modo a tentar comparar a sua composição química e estabelecer uma potencial relação com a sua origem. Os elementos analisados e o respetivo comprimento de onda estão listados na **Tabela 2**. O digestor de micro-ondas em vasos fechados da marca BERGHOF, modelo Speedwave 4, foi usado para mineralizar as amostras de queijo. Para análise dos microelementos, utilizou-se o nebulizador U-5000AT+ Ultrasonic Nebulizer.

Tabela 2. Elementos analisados por ICP-OES e respetivo comprimento de onda

Elemento	Comprimento de onda de emissão (nm)
Ca	396,847
Na	588,995
P	213,618
Mg	280,271
K	766,490
Al	308,213
Sr	421,552
Zn	213,859
As	228,811
Ba	233,527
Mn	257,610
Co	238,892
Cu	324,752
Cr	267,716
Fe	239,562
Ni	221,648
Pb	220,356
Se	196,027

Reagentes e químicos

Todos os produtos químicos usados foram de grau analítico. Todo o plástico e vidro foram limpos por imersão em ácido nítrico 5 % (p/p) e foram enxaguados com água destilada antes de usar. O ácido nítrico (65 %, p/p) foi fornecido pela Riedel-de Haën™ (Honeywell) e o peróxido de hidrogénio (30 %) foi fornecido pela Panreac AppliChem.

Preparação de amostras

As amostras de queijo, que se encontravam armazenadas a -20 °C, foram colocadas a 105 °C durante 8 h. Este passo permitiu facilitar a mineralização da matriz orgânica e, ao mesmo tempo, reduzir a diluição dos minerais nos restantes componentes das amostras. As amostras de queijo secas foram esmagadas com a ponta de uma espátula até a obtenção de um pó fino. Uma alíquota de 0,4 g de pós de cada um dos queijos foi transferida para vasos de Teflon (DAP-60^{+}), à qual se adicionou 7 mL de ácido nítrico 65 % (p/p) e 1,5 mL de peróxido de hidrogénio 30 % (p/v). Agitou-se a mistura e esperou-se 10 min antes de fechar os vasos. As amostras foram posteriormente mineralizadas usando o procedimento de digestão descrito na **Tabela 3**. Todas as digestões foram preparadas em duplicado.

Tabela 3. Procedimento de temperatura aplicado no digestor

Passo	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Tempo de rampa (min)	Tempo de aquecimento (min)	*Power* (%)
1	145	30	2	5	70
2	170	30	5	10	80
3	190	35	2	15	90
4	50	25	1	10	0

Os vasos foram arrefecidos automaticamente durante 20 min a seguir ao programa de digestão estar completo. Após mineralização, as amostras foram diluídas 130 vezes para análise dos macro elementos e 6,5 vezes para análise dos microelementos, através da transferência para um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi perfeito com água ultrapura desionizada. O procedimento de limpeza dos vasos de digestão foi realizado no sistema de digestão por micro-ondas usando 10 mL de ácido nítrico 65 % (p/p) e de seguida foi realizada uma lavagem final com 25 mL de água ultrapura.

Curvas de calibração

As curvas de calibração para macro e microelementos foram preparadas a partir de uma solução padrão a 100 mg/L contendo seleneto de sódio (elemento Se), ácido fosfórico (elemento P) e uma Multi-Element Standard Solution (Perkin Elmer; contendo os restantes elementos a analisar). A solução padrão foi diluída para concentrações de 0,5, 2,5, 5,0, 7,5 e 10 mg/L para os macro elementos e 0,0025, 0,005, 0,01, 0,05 e 0,1 mg/L para os microelementos.

Análise estatística

Os dados de concentração do conteúdo mineral foram convertidos em mg por Kg de amostra e estes foram submetidos a uma *ANOVA de uma via*, usando o software GraphPad Prism 7.0.

A composição mineral (macro e micro) de queijos de diferentes produtores da região da Serra da Estrela e de um queijo não DOP da região da Beira Baixa, analisada por ICP-OES, encontra-se descrita na **Tabela 4.** Atualmente não existe acordo entre autores em relação à quantidade de minerais presente normalmente em leite e seus derivados, pois os valores são dependentes dos métodos analíticos utilizados, quer na preparação das amostras (digestões) quer no equipamento de ICP e de deteção. De notar que o facto de as amostras de queijo terem sido secas antes de digeridas facilitou o processo de digestão dos compostos orgânicos.

Analisando os resultados obtidos por ICP-OES (**Tabela 4**) verificou-se que os elementos para os quais existem diferenças estatisticamente significativas entre o valor de quantidade no queijo não DOP e os valores nos queijos DOP (Queijo SE, Queijo AL, Queijo PR, Queijo FR, Queijo QL) são Ca, Na, Mg, Al, Sr, Zn, Mn e Cu. De entre estes elementos destacam-se o Sr, o Zn e o Mn, devido ao facto das diferenças destes elementos entre o queijo não DOP e os queijos DOP serem mais significativas do que no caso dos restantes elementos. O elemento Mn apresentou a maior diferença significativa ($p<0,0001$) entre o queijo não DOP e o queijo DOP Serra da Estrela, de entre todos os elementos analisados, indicando que poderá ser um dos elementos a ser usado na diferenciação de queijos. No entanto, para comprovar este resultado será necessário repetir a análise de todos os elementos em amostras de outros queijos DOP e não DOP, tendo sempre em consideração a origem do leite usado no fabrico desses queijos.

As quantidades de Ca, Na, P, Mg, K e Se obtidas para todos os queijos analisados vão de encontro aos valores descritos por Manuelian *et al.* (2017) para o queijo italiano Pecorino; os restantes elementos apresentam valores próximos daqueles descritos por Coni *et al.* (1996) para um queijo de ovelha produzido com leite da região de Umbria (Itália), exceto no caso dos elementos Cr e Ni, que apresentam valores, em média, cerca de 22 vezes superiores aos descritos por estes autores.

Analisando especificamente a distribuição de alguns metais pesados (como por exemplo, Co, Cu, Cr, Ni, Pb, As, Se e Zn) nos queijos DOP e no queijo não DOP verifica-se que as diferenças de quantidade foram praticamente negligenciáveis para a maioria dos elementos, exceto no caso do Zn que apresentou uma quantidade cerca de 3,5 vezes superior no queijo

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

não DOP. Este elemento poderá ser usado para uma eventual distinção entre queijos DOP e não DOP, no entanto, será necessário analisar mais replicados de amostras destes e outros queijos para comprovação deste resultado.

Após a análise da composição mineral dos cinco queijos de diferentes produtores da região da Serra da Estrela e de um queijo não DOP da região da Beira Baixa, concluiu-se que elementos como o Sr, o Zn e o Mn apresentaram as diferenças mais significativas entre o queijo não DOP e os queijos DOP do que os restantes elementos. Estes resultados indicam que estes elementos são potenciais elementos a serem usados na diferenciação de queijos. Assim, conclui-se que o ICP-OES mostrou ser uma técnica útil e sensível na determinação de minerais (macro e microelementos) em amostras de queijos, apesar da preparação das amostras se ter mostrado morosa (cerca de 1 dia).

Tabela 4. Quantificação (em mg /Kg de peso fresco) de minerais em diferentes queijos DOP da região da Serra da Estrela e um queijo não DOP. Os valores apresentados indicam a média de duas réplicas independentes e o respetivo desvio padrão. A ANOVA de uma via realizada foi feita comparando os valores obtidos para cada queijo de ovelha DOP com o queijo de ovelha não DOP (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001)

Mineral	Queijo de ovelha não DOP	Queijo SE	Queijo AL	Queijo PR	Queijo FR	Queijo QL
Ca	10025,415 ± 841,811	13394,210 ± 49,937	11450,190 ± 134,807	14960,840 ± 1846,138 *	17163,090 ± 842,887**	13947,430 ± 611,637
Na	11086,945 ± 228,398	9888,467 ± 128,890	9832,799 ± 5,807 *	9758,033 ± 75,066*	10912,250 ± 545,905	8702,782 ± 93,574**
P	3332,237 ± 176,564	4217,551 ± 135, 813	3827,434 ± 26,295	4479,100 ± 780,842	5250,285 ± 148,051*	4646,257 ± 132,413
Mg	437,374 ± 0,211	811,484 ± 88,262*	807,479 ± 36,465 *	749,881 ± 103,456 *	822,258 ± 41,299*	809,827 ± 55,388 *
K	10,153 ± 0,289	1268,540 ± 198,624	975,024 ± 23,343	862,176 ± 178,458	1220,334 ± 342,412	1566,338 ± 290,615
Al	10,752 ± 0,405	28,592 ± 4,834**	19,890 ± 2,210	16,851 ± 2,210	17,404 ± 0,553	21,133 ± 2,072
Sr	6,882 ± 0,156	14,365 ± 0,000	13,398 ± 0,414	23,619 ± 1,243**	32,045 ± 5,249***	13,260 ± 0,276
Zn	22,422 ± 3,555	74,311 ± 6,354***	54,836 ± 7,044**	78,731 ± 0,276***	70,858 ± 1,243***	69,753 ± 1,243***
As	0,231 ± 0,041	0,151 ± 0,003	0,154 ± 0,007	0,172 ± 0,003	0,166 ± 0,009	0,156 ± 0,002
Ba	1,615 ± 0,118	1,836 ± 0,265	1,818 ± 0,073	3,028 ± 0,172*	2,884 ± 0,617	1,505 ± 0,011
Mn	0,525 ± 0,007	1,449 ± 0,066****	0,754 ± 0,042*	0,825 ± 0,038*	0,828 ± 0,068*	0,889 ± 0,002**
Co	0,223 ± 0,047	0,147 ± 0,006	0,151 ± 0,005	0,161 ± 0,007	0,160 ± 0,005	0,157 ± 0,002
Cu	2,057 ± 0,200	0,936 ± 0,104**	0,942 ± 0,070**	2,304 ± 0,160	1,459 ± 0,134	0,622 ± 0,104**
Cr	0,486 ± 0,033	0,580 ± 0,046	0,660 ± 0,178	0,557 ± 0,002	0,559 ± 0,018	0,530 ± 0,076
Fe	2,294 ± 0,052	13,398 ± 4,834	10,359 ± 4,282	7,321 ± 0,414	7,044 ± 0,138	9,254 ± 0,691
Ni	0,281 ± 0,006	0,397 ± 0,035	0,370 ± 0,072	0,335 ± 0,026	0,330 ± 0,017	0,324 ± 0,063
Pb	0,461 ± 0,052	0,390 ± 0,100	0,415 ± 0,061	0,478 ± 0,074	0,463 ± 0,085	0,464 ± 0,018
Se	0,599 ± 0,042	0,568 ± 0,034	0,567 ± 0,029	0,564 ± 0,016	0,593 ± 0,039	0,564 ± 0,004

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

- ***Ensaios químicos***

Análise de gordura

No dia anterior à realização dos ensaios químicos, mais concretamente para a análise de gordura, colocaram-se na estufa tubos de *Falcon* (3 amostras x 3 réplicas) à temperatura de 105 °C. No dia seguinte, retiraram-se os tubos de *Falcon* e foram colocados no exsicador durante 1 hora e posteriormente pesados.

Para a preparação das amostras de queijo, começou-se por pesar, em tubos de *Falcon*, 0,5 g de queijo desidratado (105 ˚C) e triturado. Adicionou-se 4,5 ml de H_2O e a mistura foi homogeneizada num *ultraturrax*. Após a homogeneização e já na *Hotte*, foram adicionados 0,5 ml de hidróxido de amónia (NH_4OH) e aplicou-se o *vórtex* em todas as amostras. De seguida, adicionaram-se de 2,5 ml de ácido clorídrico (HCl), aplicou-se o *vórtex* e colocaram-se os tubos de *Falcon* num banho de água a ferver durante 20 minutos. Ao fim desse tempo, retiraram-se os tubos de *Falcon* e deixou-se arrefecer.

Para a preparação das amostras de água destilada, pesou-se em tubos de *Falcon* 5 g de água destilada. Após a preparação de todas as soluções, adicionaram-se 5 mL de álcool etílico, 12,5 mL de éter etílico e 12,5 mL de éter de petróleo a cada solução. Entre as adições dos reagentes, aplicou-se o *vórtex* em todas as amostras, de forma a garantir uma boa homogeneização e após a agitação abriram-se ligeiramente as tampas para aliviar a pressão. Centrifugaram-se as amostras a 600 rpm durante 60 s e separaram-se as fases, sendo que as fases superiores foram colocadas nos tubos de *Falcon* secos no dia anterior e estes foram colocados em banho-maria de forma a evaporar os reagentes.

No que diz respeito às fases inferiores, adicionaram-se a cada solução 2,5 mL de álcool etílico, 7,5 mL de éter etílico e 7,5 mL de éter de petróleo. Centrifugaram-se as amostras a 600 rpm durante 60 s e separaram-se as fases, sendo que as fases superiores foram adicionadas aos tubos de *Falcon* em banho-maria e estes foram colocados novamente em banho-maria. Foi novamente adicionado às fases inferiores 7,5 mL de éter etílico e 7,5 mL de éter de petróleo, centrifugaram-se as amostras a 600 rpm durante 60 s e separaram-se, novamente, as fases, sendo que as fases superiores foram adicionadas aos tubos de *Falcon* em banho-maria e estes foram colocados novamente em banho-maria. Após a evaporação dos reagentes, os tubos de *Falcon* foram transferidos para uma estufa a 105 °C até peso constante. No dia seguinte, retiraram-se os tubos de *Falcon* da estufa, foram colocados num exsicador durante o tempo necessário até arrefecerem e, posteriormente foram pesados. Para o cálculo da % de gordura utilizou-se a Equação 1.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

$$\% \, Gordura = \frac{(Tubo\ de\ falcon\ com\ gordura - Tubo\ de\ falcon\ vazio) - peso\ médio\ da\ água}{Peso\ inicial\ da\ amostra} \times 100$$ Equação 1

Humidade

No dia anterior à realização da análise, colocaram-se os cadinhos na estufa à temperatura de 105 °C para estabilizar o seu peso. No dia da análise, colocaram-se os cadinhos no interior de um exsicador à temperatura ambiente, durante uma hora para arrefecerem. Pesaram-se os cadinhos e colocou-se 2 gramas de amostra de queijo e registaram-se as respetivas massas. Os cadinhos foram colocados durante 2 h na estufa a 105 °C. Retiraram-se os cadinhos para um exsicador, deixou-se arrefecer e foram pesados. Os cadinhos foram colocados novamente na estufa durante 1 horas, retirados para um exsicador, deixou-se a arrefecer e foram pesados novamente. Repetiu-se este processo até a massa aumentar. Para o cálculo da % de sólidos totais utilizou-se a Equação 2.

$$Humidade\ (\%) = \frac{(w_1 - w) - (w_2 - w)}{(w_1 - w)} \times 100$$ Equação 2

Cinzas

Para a análise de cinzas foram utilizadas as amostras já secas da análise do teor de humidade. Procedeu-se à calcinação dos cadinhos com as amostras, na mufla a 550 °C, até à obtenção de um resíduo branco, aproximadamente 4 horas após a mufla ter atingido 550 °C. De seguida, colocaram-se os cadinhos num exsicador até arrefecerem e foram pesados novamente. Para o cálculo da % de cinzas utilizou-se a Equação 3.

$$\% \, Cinzas = \frac{100 \times (Massa\ do\ cadinho\ vazio - Massa\ do\ cadinho\ com\ cinzas)}{(Massa\ do\ cadinho\ com\ amostra - Massa\ do\ cadinho\ vazio)}$$ Equação 3

Atividade de água

Para a determinação da atividade da água utilizou-se um medidor de atividade da água laboratorial. Para tal, colocou-se uma pequena porção das amostras de queijo no recipiente que pertence ao medidor, e este foi inserido no equipamento e iniciou-se a leitura da atividade de água.

pH

Para a medição do pH foi necessário proceder à preparação prévia de amostras de queijo. Começou-se por triturar 10 gramas de queijo e misturou-se com 105 ml de água à temperatura de 40 °C. Após a homogeneização da solução, deixou-se assentar e filtrou-se. As

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020 | PORTUGAL 2020 | UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

amostras foram arrefecidas até à temperatura ambiente e medido o pH através de um equipamento medidor do pH.

Acidez titulável

Para a determinação da acidez titulável utilizou-se 25 ml das mesmas soluções da medição do pH e um titulador automático, Titroline 6000 da S.I. Analytics (Alemanha), onde se definiu o pH do ponto de viragem de 8,3. A solução foi titulada com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N. Para o cálculo da % de humidade utilizou-se a Equação 4.

$$\% \, Acidez = \frac{V \times f \times 90 \times 0{,}1}{10 \times m}$$ Equação 4

Onde,

V = Volume gasto de NaOH 0,1 N; F = Fator de correção da solução de hidróxido de sódio a 0,1 N (volume teórico/volume real); 0,1 = normalidade da solução de NaOH; 90 = equivalente grama de ácido lático (ácido predominante); m = massa de amostra em gramas.

Textura

A medição da textura foi efetuada com um texturómetro *CT3 Brookfield* equipado com a sonda cilíndrica de mm. O teste utilizado foi o modo TPA (*texture profile analyser*) de acordo com as condições exibidas na **Tabela 5**.

Os queijos foram cortados em cubos com 21,0 ± 0,1 mm de altura e 18,0 ± 0,1 mm de largura e deixados à temperatura ambiente.

Tabela 5. Condições de teste para analisar a textura de amostras de queijo

Velocidade pré-teste	5 mm/s
Velocidade teste	5 mm/s
Teste de alcance de fratura	1%
Alcance	50%
Força	0,98%
Tempo	5 s

FTIR

A determinação dos espetros de infravermelho por FTIR para os queijos, produzidos com leite de variadas origens (queijo de ovelha, queijo de mistura, queijo de vaca, queijo de cabra), foi efetuada com espetrómetro de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Shimadzu, Japão) acoplado de um acessório de reflexão total atenuada (ATR) (Shimadzu,

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020 | PORTUGAL 2020 | UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

Japão). Para cada análise a amostra foi irradiada com radiação de infravermelho de 4000 a 500 cm^{-1}, no modo de transmitância.

Resultados

- *% Gordura*

O estudo da percentagem de gordura em queijos foi efetuado em dois ensaios separados. No primeiro ensaio foram analisados um queijo de vaca amanteigado (Queijos Tavares, S.A., região Seia) e um queijo de ovelha curado (Queijos Tavares, S.A., região Seia). Já no segundo ensaio foram analisados um queijo de cabra (Queijos Lagos, região de Seia) e um queijo de mistura, produzido através da mistura leite de ovelha, vaca e cabra (Continente, SONAE). Os resultados destes ensaios encontram-se apresentados na **Tabela 6**.

Através da análise da **Tabela 6**, é possível verificar que em amostras diferentes do mesmo queijo de vaca amanteigado (QV), os valores determinados da percentagem de gordura variaram mais do que seria o esperado entrem si. Os restantes queijos apresentaram variações menores. Contudo, comparando os quatro queijos, foi possível observar uma ligeira diferenciação entre eles, sendo que o queijo de mistura (QM) apresentou uma percentagem de gordura menor e bem distinta dos restantes três queijos. Posto isto, a gordura poderá ser um bom parâmetro físico-químico para distinguir queijos de diferentes origens animais.

Tabela 6. Resultados dos ensaios para determinação da gordura em queijos de ovelha curado, vaca amanteigado, cabra curado e mistura (leite de ovelha, vaca e cabra)

Ensaio 1				Ensaio 2			
Amostra	**% Gordura**	**Média % Gordura**	**Desvio padrão**	**Amostra**	**% Gordura**	**Média % Gordura**	**Desvio padrão**
Água 1	0,0020	0,0052	0,0033	**Água 1**	0,1297	0,1814	0,0442
Água 2	0,0097			**Água 2**	0,1766		
Água 3	0,0040			**Água 3**	0,2377		
QV[1] 1	45,3260	39,6949	4,3111	**QC[3] 1**	37,2362	38,3679	0,9515
QV 2	38,9033			**QC 2**	38,3033		
QV 3	34,8554			**QC 3**	39,5643		
QOC[2] 1	36,4758	40,0923	2,5599	**QM[4] 1**	28,0005	29,8982	1,4223
QOC 2	41,7589			**QM 2**	30,2694		
QOC 3	42,0423			**QM 3**	31,4246		

[1] Tubo de *Falcon* do queijo de vaca
[2] Tubo de *Falcon* do queijo de cabra
[3] Tubo de *Falcon* do queijo de ovelha curado
[4] Tubo de *Falcon* do queijo de mistura (leite de ovelha, vaca e cabra)

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020 | PORTUGAL 2020 | UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

- *Humidade*

A análise da humidade foi efetuada aos quatro queijos simultaneamente e os resultados estão apresentados na **Tabela 7**. Pelos resultados apresentados foi possível observar que a percentagem de humidade diferiu entre os diferentes queijos, sendo que o queijo de ovelha curado (QOC) apresentou uma maior percentagem de humidade e o queijo de mistura (QM) foi o queijo com menor percentagem de humidade. Pela análise das réplicas de todas as amostras foi possível observar grandes variações dentro da mesma amostra nos queijos de vaca (QV), cabra (QC) e mistura (QM), pelo que seria adequado repetir o ensaio, de forma a compreender se estas variações ocorrem por instabilidade dos queijos ou ainda se ocorrerão porque as amostras foram recolhidas de diferentes zonas dos queijos, isto é, zona mais interior ou zona mais próxima da casca.

Tabela 7. Resultado do ensaio para determinação da humidade em queijos de ovelha curado (QOC), vaca amanteigado (QV), cabra curado (QC) e mistura (QM) (mistura de leites de ovelha, vaca e cabra)

Amostra		% Humidade	Média % humidade	Desvio-padrão
QOC	**1**	38,9163	40,4237	1,0786
	2	40,9756		
	3	41,3793		
QV	**1**	37,9808	41,5357	6,9277
	2	35,4067		
	3	51,2195		
QC	**1**	33,8095	33,4075	2,9192
	2	36,7647		
	3	29,6482		
QM	**1**	32,0388	31,4585	2,3251
	2	28,3654		
	3	33,9713		

- *Cinzas*

A análise das cinzas foi efetuada aos quatro queijos simultaneamente, com as amostras desidratadas após a análise da humidade (**Tabela 8**). Pela análise dos resultados da **Tabela 8** foi possível verificar que o queijo de ovelha curado foi o queijo com maior percentagem de cinzas, seguido do queijo de cabra, queijo de vaca e por último queijo de mistura. Apesar da visível distinção nas médias de cada queijo, quando analisadas as réplicas de cada um, foi possível verificar uma disparidade entre réplicas da mesma amostra de queijo e valores próximos de réplicas de amostras diferentes, como por exemplo, a percentagem de cinzas da

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

amostra dois do queijo de ovelha curado (QOC) e as amostras dois e três do queijo de vaca amanteigado (QV). Assim, seria aconselhável a repetição desta análise para comprovação dos resultados obtidos.

Tabela 8. Resultados do ensaio para determinação das cinzas em queijos de ovelha curado (QOC), vaca amanteigado (QV), cabra curado (QC) e mistura (QM) (mistura de leites de ovelha, vaca e cabra)

Amostra		% Cinzas	Média % cinzas	Desvio padrão
QOC	**1**	10,4839	10,4511	1,7722
	2	8,2645		
	3	12,6050		
QV	**1**	6,2016	7,4499	0,8848
	2	8,1481		
	3	8,0000		
QC	**1**	9,3525	9,3744	1,8311
	2	11,6279		
	3	7,1429		
QM	**1**	5,0000	5,8183	1,1065
	2	7,3826		
	3	5,0725		

- *Atividade de água*

A análise da atividade de água (a_w) foi efetuada aos quatro queijos, utilizando um equipamento laboratorial. Pela análise dos resultados (**Tabela 9**) foi possível verificar que a Aw foi diferente nos diferentes queijos, sendo maior no queijo de mistura e menor no queijo de ovelha curado. Foi ainda possível observar que os valores da a_w entre réplicas variaram insignificantemente, fazendo da atividade da água um bom parâmetro físico-químico para distinção de queijos produzidos com diferentes tipos de leite.

Tabela 9. Resultados dos ensaios para determinação da atividade da água (a_w) em queijos de ovelha curado (QOC), vaca amanteigado (QV), cabra curado (QC) e mistura (QM) (mistura de leites de ovelha, vaca e cabra)

Amostra		a_w	Média a_w	Desvio padrão
QOC	1	0,914	0,914	0,002
	2	0,917		
	3	0,912		
QV	1	0,932	0,929	0,004
	2	0,921		
	3	0,927		
	4	0,932		
	5	0,932		

QC	1	0,927	0,926	0,001
	2	0,924		
	3	0,927		
QM	1	0,948	0,943	0,004
	2	0,941		
	3	0,940		

- *pH*

A análise do pH foi efetuada aos quatro queijos utilizando um aparelho medidor de pH e os resultados estão apresentados na **Tabela 10**. Analisando a tabela é possível constatar uma diferenciação entre os valores do pH para os diferentes queijos, sendo maior no queijo de cabra e menor no queijo de mistura. É ainda possível observar que os valores do pH entre réplicas variam insignificantemente, fazendo do pH um bom parâmetro físico-químico para distinção de queijos produzidos com diferentes tipos de leite.

Tabela 10. Resultados do ensaio para determinação do pH em queijos de ovelha curado (QOC), vaca amanteigado (QV), cabra curado (QC) e mistura (QM) (mistura de leites de ovelha, vaca e cabra).

Amostra		pH	Média do pH	Desvio padrão
QOC	**1**	5,53	5,51	0,01
	2	5,50		
	3	5,51		
QV	**1**	5,74	5,79	0,04
	2	5,82		
	3	5,82		
QC	**1**	5,96	5,95	0,01
	2	5,95		
	3	5,94		
QM	**1**	5,30	5,27	0,02
	2	5,26		
	3	5,25		

- *Acidez titulável*

A análise da acidez titulável foi efetuada aos quatro queijos. Pela análise dos resultados (**Tabela 11**) foi possível verificar que a acidez titulável variou nos diferentes queijos, exceto entre o queijo de ovelha curado (QOC) e o queijo de vaca amanteigado (QV). O maior valor de acidez titulável foi obtido no queijo de mistura (QM) e o menor no queijo de cabra (QC). Como já referido, entre o QOC e o QV a percentagem de acidez titulável não apresentou uma diferença significativa. No entanto, à semelhança do referido para outros parâmetros

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020 | PORTUGAL 2020 | UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

analisados, seria interessante a repetição deste ensaio e com diferentes amostras de queijo feito com leite de ovelha e de queijo de leite de vaca, para que esta diferença possa ser explicada.

Tabela 11. Resultados do ensaio para determinação da percentagem de acidez titulável em queijos de ovelha curado (QOC), vaca amanteigado (QV), cabra curado (QC) e mistura (QM) (mistura de leites de ovelha, vaca e cabra).

Amostra		% Acidez titulável	Média da % acidez titulável	Desvio padrão
QOC	**1**	11,32325	10,9803	0,3477
	2	10,50360		
	3	11,11402		
QV	**1**	11,56920	10,9959	0,5000
	2	10,35080		
	3	11,06758		
QC	**1**	5,25866	7,3712	1,5017
	2	8,23931		
	3	8,61558		
QM	**1**	14,17834	14,7020	0,4125
	2	14,74106		
	3	15,18645		

- *Textura*

Na análise da textura foram tidos em conta quatro parâmetros: a dureza, sendo esta uma propriedade mecânica da textura relacionada com a força necessária para obter a deformação de um produto ou uma dada penetração; a coesividade e esta pode ser definida como sendo uma propriedade mecânica da textura relacionada com o nível até ao qual um material pode ser deformado antes de se partir; a elasticidade que é uma propriedade mecânica da textura relacionada com a rapidez de recuperação após a aplicação de uma força deformante e o modo como o material deformado volta à sua condição primitiva após ter cessado a força deformante; e, por último, a adesividade, que se caracteriza com sendo uma propriedade mecânica da textura, relacionada com a força necessária para deslocar um produto que adere a uma superfície.

Na **Tabela 12** estão apresentados os resultados para o queijo de ovelha curado, queijo de vaca amanteigado, queijo de cabra curado e queijo de mistura. De notar que o parâmetro de dureza apresenta dois valores, uma vez que o texturómetro quantifica a dureza em duas compressões.

Neste procedimento, as amostras de queijo encontravam-se à temperatura ambiente e os resultados apresentados na **Tabela 12** demonstraram algumas diferenças entre os queijos. Atendendo à dureza, foi possível verificar que o QOC é menos duro, ou seja, é o queijo mais fácil de deformar, enquanto que o QM revelou-se o queijo mais difícil de deformar entre os queijos analisados. Quanto ao parâmetro da coesividade, os valores obtidos para os quatros queijos estão muito próximos entre si, tornando este parâmetro menos interessante para o estudo. No que diz respeito à elasticidade, foi possível verificar que o valor mais elevado foi obtido no queijo de vaca, prossupondo assim que o QV recupera a sua forma mais rapidamente do que os restantes aquando da aplicação de uma força deformante. Quanto ao parâmetro da adesividade, assim como na coesividade, os valores obtidos para os quatros queijos estão muito próximos entre si, tornando este parâmetro menos interessante para o estudo da discriminação da origem dos vários tipos de queijo.

Tabela 12. Resultados do ensaio para a análise da textura em queijos de ovelha curado (QOC), vaca amanteigado (QV), cabra curado (QC) e mistura (QM) (mistura de leites de ovelha, vaca e cabra)

Amostra		Dureza		Coesividade	Elasticidade	Adesividade
QOC		72,50	59,50	2,29	2,70	0,38
QV		233,00	241,50	1,13	3,70	0,52
QC	**1**	321,00	276,50	0,98	1,60	0,11
	2	228,50	189,00	4,06	1,50	0,76
	3	277,50	251,00	1,69	2,20	0,23
QM	**1**	618,50	508,50	0,59	1,40	0,11
	2	695,00	595,00	1,73	1,80	0,27
	3	672,00	580,00	0,77	1,70	0,08

- *FTIR*

Primeiramente, foram considerados neste estudo de análise por espectroscopia de infravermelho, o queijo de ovelha, queijo de mistura, queijo de vaca e queijo de cabra, para efeitos comparativos e discriminatórios. O estudo foi iniciado com a análise do queijo da ovelha desta região (Queijos Tavares, S.A., região de Seia; queijo não DOP), cujo espectro de infravermelho é apresentado na **Figura 3**. O espectro de infravermelho deste tipo de queijo revelou um conjunto variado de bandas de várias intensidades que podem ser atribuídos a variados grupos funcionais. De forma a facilitar a interpretação do espectro, foram selecionadas 3 regiões discriminantes (I a III) (Karoui *et al.*, 2005): a região I de 3000 a 2800 cm^{-1}; a região II de 1700 a 1500 cm^{-1} e a região III de 1500 a 500 cm^{-1}.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

Na zona anterior à região I foi possível observar uma banda larga em torno de 3300 cm^{-1}, que corresponde a vibração *streching* O-H, indicando a presença de água. Uma vez que a presença de água no queijo é variável em função de condições de conservação e maturação, esta banda não pôde ser usada como fator de discriminação (Karoui *et al*., 2007), portanto não foi incluída nas regiões atrás consideradas.

A região I (3000 a 2800 cm^{-1}), onde é possível observar as bandas 2916 e 2848 cm^{-1} correspondentes a C-H do metileno modo *streching* anti-simetrico e simétrico, respetivamente e também banda mais fraca a 2964 cm^{-1}correspondente ao modo *streching* do C-H dos metilos terminais (**Figura 3**), está relacionada com a presença de ácidos gordos (Dufour *et al*., 2000; Karoui *et al*., 2005;). Estas bandas podem apresentar intensidades variáveis consoante o tipo de queijo.

A região II (1700 a 1500 cm^{-1}) mostra primeiramente a banda com intensidade elevada a 1741 cm^{-1}correspondente a vibração *stretching* de C=O (**Figura 3**), indicando a presença de ácidos carboxílicos, nomeadamente ácidos gordos, aldeídos e ésteres. A presença das bandas 1643 e 1548 cm^{-1} está relacionada com o grupo funcional amida das proteínas (Mazerolles *et al*., 2001; Karoui *et al*., 2004; Karoui *et al*., 2005), sendo a 1643 cm^{-1} identificada com a vibração *stretching* de C=O, também designada de Amida I e a 1548 cm^{-1} com o modo *bending* de N-H, designada de Amida II.A elevada intensidade destas bandas é uma evidência da presença de proteínas, da sua estrutura secundária e estado de agregação (Mazerolles *et al*., 2001).

A região III (1500 a 500 cm^{-1}) corresponde à zona da impressão digital; nesta é possível observar numerosas pequenas bandas correspondentes às cadeias laterais de aminoácidos, nomeadamente entre 1153 e 900 cm^{-1} onde se localizam vibrações de *stretching* de C-O e C-C, e também diversas vibrações de modo *bendind*, 1462 cm^{-1}(H-C-O,*bending*),1406 cm^{-1}(C-C-H, *bending*), 1238 cm^{-1}(C-C-H,*bending*), 1172 cm^{-1}(C-O,bending(grupo ester)(Karoui *et al*., 2007). Adicionalmente ainda é possível observar as bandas 1118 e 1060 cm^{-1} correspondentes ao grupo P=O de compostos fosforados (Karoui *et al*., 2007) e também a 983 a banda correspondente ao modo C-H, *out-of-plane deformation*, indicando a presença de aminoácidos insaturados. Nesta região ainda é possível observar a banda larga e intensa a 650 cm^{-1} correspondente a C-H *bending* de compostos insaturados (incluindo alcenos) e aromáticos, apesar da sua intensidade não permitir a distinção espectroscópica ente diferentes tipo de queijo.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

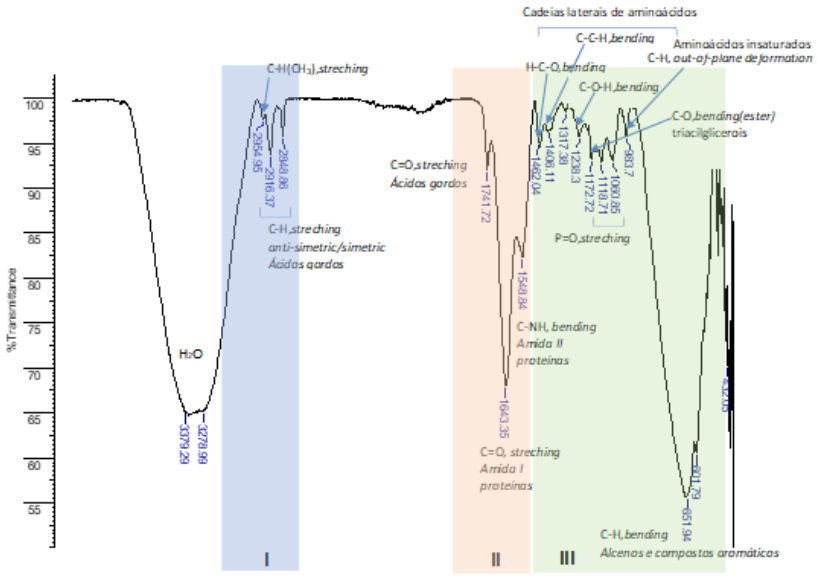

Figura 3. Espectro de infravermelho de amostra QOC1 (Queijo de ovelha curado). Azul-Região I; rosa Região II; verde- Região III.

Adicionalmente, foi efetuada uma análise por infravermelho de outros tipos de queijo, com o objetivo de simular possíveis situações de adulteração de queijo de ovelha, com leite de vaca e/ou de cabra e identificar possíveis diferenças entre estes queijos e o de queijo exclusivamente constituído por leite de ovelha (queijo de Serra da Estrela). Serão apresentados de seguida, de forma resumida, os resultados da comparação entre os espectros obtidos nesta análise.

Inicialmente efetuou-se a comparação do queijo de ovelha com amostras de queijo de mistura produzido através de leite de ovelha, cabra e vaca. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na **Figura 4** e na **Tabela 13**.

Na **Tabela 13** destacam-se apenas as zonas do espectro consideradas como discriminantes (região I a III). A análise do espectro de infravermelho (**Figura 4**) mostra que a diferença entre os espectros dos 2 queijos se centra na região III e nas várias pequenas bandas correspondentes às cadeias laterais de aminoácidos, nomeadamente entre 1153 e 900 cm^{-1}, onde se localizam vibrações de *stretching* de C-O e C-C, e também diversas vibrações de modo *bendind*. As bandas 1116 e 1058 cm^{-1}, correspondentes ao grupo P=O de fosfolipídeos, e também a 983 cm^{-1} a banda correspondente ao modo C-H, *out-of-plane deformation*, indicam a presença de aminoácidos insaturados (**Tabela 13**). Concluiu-se que, de um modo geral, para o leite de ovelha, as bandas descritas são bastante menos intensas do que no caso do queijo de mistura. Não se constatou o aparecimento de novas bandas significativas na amostra de queijo de mistura.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

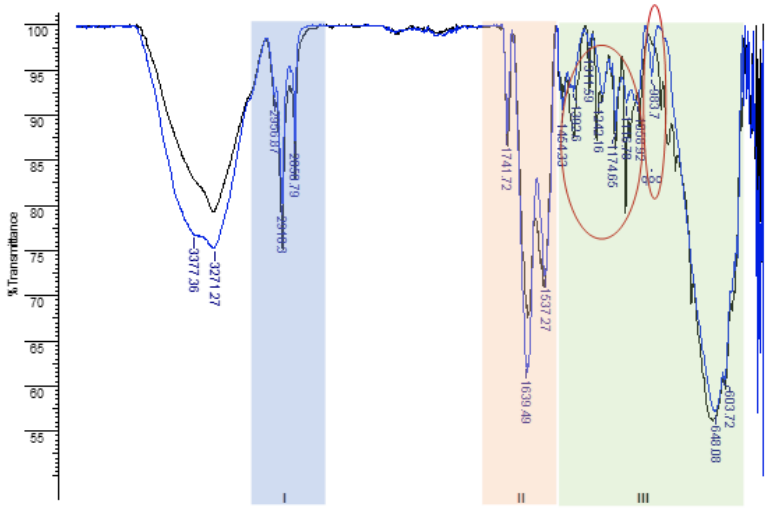

Figura 4. Comparação das amostras: queijo de ovelha curado (azul) *vs.* queijo de mistura (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.

Tabela 13. Comparação das amostras: queijo de ovelha curado *vs.* queijo de mistura, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1]

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Queijo de ovelha curado	2956 cm^{-1} C-H(CH3), stretching,p 2910 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1741 cm^{-1} C=O,*stretching,m* 1639 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1537 cm-1 C-NH, bending (Amida II), g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1392 cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1174 cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1116 e 1058 cm^{-1} P=O,*streching,p* 983 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation , m*	A diferença entre os espectros dos queijos é na zona III, correspondendo a diferenças ao nível da presença de aminoácidos e aminoácidos insaturados e compostos fosfatados
Queijo de mistura	2956 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2910 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1741 cm^{-1} C=O,*streching,m* 1639 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1537 cm-1 C-NH, bending (Amida II), g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,m* 1392 cm^{-1} C-C-H,*bending,m* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,m* 1174 cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1116 e 1058 cm^{-1} P=O,*streching,m*	

[1]Intensidade de banda:p-pequena,m-média,g-grande

A comparação da análise do queijo de ovelha com amostras de queijo de vaca (Queijos Tavares, S.A., região Seia) é mostrada na **Figura 5** e **Tabela 14**, destacando-se apenas as zonas do espectro consideradas como discriminantes (região I a III). A análise da comparação do espectro de infravermelho (**Figura 5**) mostra que a diferença entre os espectros dos 2 queijos se centra na região III. Na zona correspondente a 1153 e 900 cm^{-}1, onde se localizam as várias pequenas bandas correspondentes às cadeias laterais de aminoácidos, como vibrações de *stretching* de C-O e C-C, e também diversas vibrações de modo *bendind*, as diferenças foram pouco significativas (**Tabela 14**). Em relação às bandas 1116 e 1058 cm^{-1}, correspondentes ao

grupo P=O de fosfolipídeos, e também à banda 983 cm^{-1}, correspondente ao modo C-H, *out-of-plane deformation*, indicando a presença de aminoácidos insaturados, verificou-se uma menor intensidade no espectro do queijo de vaca (**Tabela 14**). Concluindo, de um modo geral, não existiram diferenças acentuadas entre as 2 amostras de queijo, exceto no caso das bandas acima referenciadas, em que para o queijo de ovelha são mais intensas do que no caso do queijo de vaca. Não se constatou o aparecimento de novas bandas significativas na amostra de queijo de vaca.

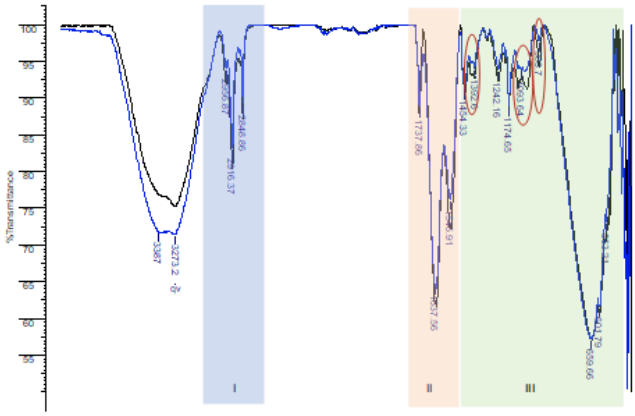

Figura 5. Comparação das amostras: queijo de vaca (azul) *vs.* queijo ovelha (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.

Tabela 14. Comparação das amostras: queijo de ovelha curado *vs.* queijo de vaca, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1]

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Queijo de ovelha curado	2956 cm^{-1} C-H(CH3), stretching,p 2910 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1741 cm^{-1} C=O,*stretching,m* 1639 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1537 cm-1 C-NH, bending (Amida II), g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1392 cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1174 cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1116 e 1058 cm^{-1} P=O,*streching,p* 983 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation, m*	A diferença entre os espectros dos queijos é na zona III, correspondendo a diferenças ao nível da presença de aminoácidos e aminoácidos insaturados e compostos fosfatados
Queijo de vaca	2956 cm^{-1} C-H(CH3), stretching,p 2916 e 2848 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1737 cm^{-1} C=O,*streching,m* 1637 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1546 cm-1 C-NH, bending (Amida II), g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,m* 1392 cm^{-1} C-C-H,*bending,m* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,m* 1174 cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1093 e 1058 cm^{-1} P=O,*streching,m* 983 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation, p*	

[1]Intensidade de banda:p-pequena,m-média,g-grande

Para finalizar, foi ainda efetuada uma análise para comparação do queijo de ovelha com amostras de queijo de cabra (Queijos Lagos, região de Seia). Os resultados obtidos são

mostrados na **Figura 6** e **Tabela 15**, destacando-se unicamente as zonas do espectro consideradas como discriminantes (região I a III). Os resultados obtidos mostram que a diferença entre os espectros dos 2 queijos se centra na região I e III. Para a região I as bandas de 2956 a 2850 cm^{-1}, correspondentes a modos C-H *streching*, atribuída à presença de ácidos gordos, são marcadamente mais intensas para o queijo de ovelha (**Figura 6**, **Tabela 15**). Na região III a diferença foi fundamentalmente nas bandas 1174 cm^{-1} C-O, *bending*(ester), 1116 e 1058 cm^{-1} P=O, *streching*, indicando a presença de aminoácidos insaturados e compostos fosforados, respetivamente, tendo sido mais intensas para o caso do queijo de ovelha (**Figura 6**, **Tabela 15**). Concluiu-se que, de um modo geral, a diferença existente entre as 2 amostras de queijo foi, no caso das bandas referenciadas para o queijo de ovelha, mais intensa do que no caso do queijo de cabra. Não se constatou o aparecimento de novas bandas significativas na amostra de queijo de vaca.

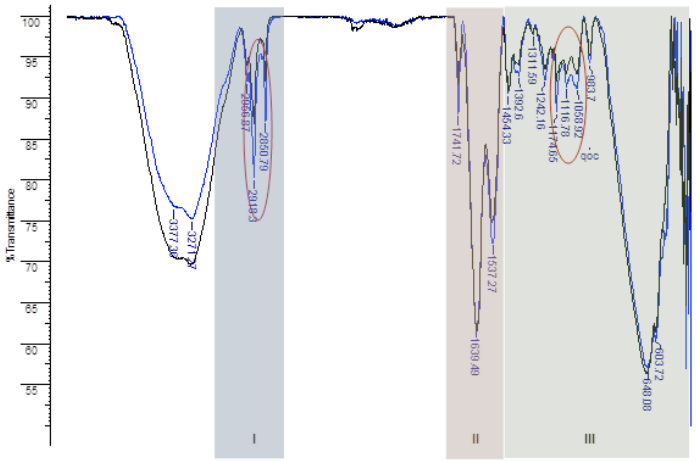

Figura 6. Comparação das amostras: queijo de ovelha curado (azul) *vs.* queijo cabra (preto).

Tabela 15. Comparação das amostras: queijo de ovelha curado *vs.* queijo de cabra, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1]

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Queijo de ovelha curado	2956 cm^{-1} C-H(CH3), stretching,p 2910 e 2850 cm^{-1} C-H *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1741 cm^{-1} C=O,*stretching,m* 1639 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1537 cm-1 C-NH, bending (Amida II), g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1392 cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1174 cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1116 e 1058 cm^{-1} P=O,*streching,p* 983 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation,m,m*	A diferença entre os espectros dos queijos é na zona I e III, correspondendo a diferenças ao nível da presença de ácidos gordos, aminoácidos insaturados e compostos fosfatados
Queijo de cabra	2956 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2918 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,p,p*	1741 cm^{-1} C=O,*streching,m* 1639 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1537 cm-1 C-NH, bending (Amida II), g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,m* 1392 cm^{-1} C-C-H,*bending,m* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,m* 1174 cm^{-1} C-O,*bending(ester),mp* 1093 e 1058 cm^{-1}P=O,*streching,p,p* 983 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation, p*	

[1]Intensidade de banda: mp-muito pequena,p-pequena,m-média,g-grande

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

Com a finalidade de verificar se existiam diferenças ao nível das caracterizações físico-químicas entre queijos Serra da Estrela DOP, foram adquiridos posteriormente quatro queijos de ovelha curado DOP de diferentes produtores: queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério, Oliveira do Hospital (QPR), queijo de ovelha curado da Queijaria dos Lobos - António F. L. Vaz Patto, Lda., Oliveira do Hospital (QL), Queijo Serra da Estrela DOP da empresa Vale da Estrela, Lda., Mangualde (DOP) e queijo de ovelha curado da empresa Maratona de Delícias, Lda., Oliveira do Hospital (QMD) (**Figura 7**). Os quatro queijos foram caracterizados quanto ao seu teor em (i) gordura; (ii) humidade; (iii) cinzas; (iv) atividade da água, (v) pH; (vi) acidez titulável; (vii) textura; e (viii) análise por FTIR. Aquando da chegada dos queijos, estes foram abertos e uma fatia de 100 gramas de cada queijo foi desidratada em estufa durante 24 horas e o restante refrigerado a 4 ˚C para se proceder a análises nos dias seguinte. No entanto, nesta data, o Governo Português decretou o primeiro estado de emergência e obrigatoriedade de teletrabalho sempre que possível, e assim não foi possível a realização de todas as análises no mês de março; apenas foram realizadas as análises da (i) humidade, (ii) cinzas, (iii) atividade da água (a_w), (iv) pH, (v) acidez titulável; (vi) parte das análises à textura e (vii) FTIR. Em junho, após o estado de emergência e regresso às entidades, foi possível apenas fazer a análise da gordura, uma vez que as amostras estavam desidratadas e armazenadas num exsicador.

Figura 7. Queijos de ovelha curado da região da Serra da Estrela. a) queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério; b) queijo de ovelha curado da Queijaria dos Lobos; c) Queijo Serra da Estrela DOP da empresa Vale da Estrela; d) queijo de ovelha curado da empresa Maratona de Delícias.

- *% Gordura*

Como referido anteriormente, os queijos de ovelha curado foram analisados quanto ao seu teor de gordura após 3 meses depois da sua receção e preparação (**Figura 8**). Desta forma, foram analisados quatro queijos em dois ensaios: queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR), queijo de ovelha curado da Queijaria dos Lobos (QL), Queijo Serra da Estrela DOP da empresa Vale da Estrela (DOP) e queijo de ovelha curado da empresa Maratona de Delícias (QAL). Na **Tabela 16** estão apresentados os resultados obtidos.

Através da análise da **Tabela 16** foi possível verificar que em amostras diferentes do mesmo queijo de ovelha curada da queijaria artesanal Paulo Rogério (QPR), os valores determinados da percentagem de gordura variaram entrem si mais do que seria o esperado. Por esta razão, o valor médio da percentagem da gordura deste queijo foi diferente dos restantes três queijos. Quanto aos restantes queijos, estes apresentaram valores próximos uns dos outros, sendo este um bom indicativo de boas práticas na produção do queijo.

Segundo o Caderno de Especificações do Queijo Serra da Estrela, a percentagem de humidade do queijo deveria estar entre 45 % e 60 %. Pelos resultados obtidos, foi possível afirmar que os queijos analisados estão afastados do requisito do Caderno de Especificações. No entanto, é de notar o tempo de espera da amostra entre o momento que foi preparada e momento em que foi analisada.

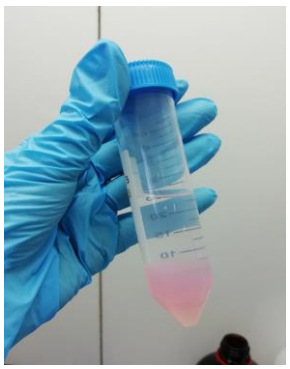

Figura 8. Determinação da percentagem de gordura em amostras de queijo de Serra da Estrela DOP.

Tabela 16. Resultados dos ensaios para determinação da gordura em queijos de ovelha curado: queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR), queijo de ovelha curado da Queijaria dos Lobos (QL), Queijo Serra da Estrela DOP da empresa Vale da Estrela (DOP) e queijo de ovelha curado da empresa Maratona de Delícias (QAL)

Ensaio 1				Ensaio 2			
Amostra	**% Gordura**	**Média % Gordura**	**Desvio padrão**	**Amostra**	**% Gordura**	**Média % Gordura**	**Desvio padrão**
Água 1	0,088	0,050	0,036	**Água 1**	0,002	0,001	0,001
Água 2	0,002			**Água 2**	0,000		
Água 3	0,060			**Água 3**	0,002		
QPR 1	29,980	34,481	4,611	**DOP 1**	34,330	37,206	2,078
QPR 2	40,817			**DOP 2**	38,125		
QPR 3	32,645			**DOP 3**	39,163		
QL 1	39,082	37,779	1,244	**QAL 1**	39,205	37,452	1,857
QL 2	38,150			**QAL 2**	38,268		
QL 3	36,105			**QAL 3**	34,882		

- *Humidade*

A análise da humidade foi realizada logo após a receção dos queijos. Na **Tabela 17** estão apresentados os resultados obtidos. Pela análise aos resultados foi possível observar que a

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

percentagem de humidade diferiu entre os diferentes queijos, sendo que o queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR) apresentou uma maior percentagem de humidade e o queijo Serra da Estrela DOP (DOP) foi o queijo com menor percentagem de humidade (**Tabela 17**). Segundo o Caderno de Especificações do Queijo Serra da Estrela, a percentagem de humidade do queijo deveria estar entre 61 % e 69 %. Os resultados obtidos mostram que os quatros queijos analisados não preenchem este requisito, sendo que o Queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério se aproxima mais do requerido no Caderno de Especificações. É de notar que este queijo foi o que apresentou visualmente as características que seriam de esperar num Queijo Serra da Estrela e apresentava uma pasta mais amanteigada do que os restantes.

Tabela 17. Resultados dos ensaios para determinação da humidade em queijos de ovelha curado: queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR), queijo de ovelha curado da Queijaria dos Lobos (QL), Queijo Serra da Estrela DOP da empresa Vale da Estrela (DOP) e queijo de ovelha curado da empresa Maratona de Delícias (QAL)

Amostra	% Humidade	Média % humidade	Desvio padrão
QPR 1	54,50	53,64	0,64
QPR 2	53,43		
QPR3	52,97		
QL 1	40,29	42,70	1,81
QL 2	43,14		
QL 3	44,66		
DOP 1	39,42	39,72	1,23
DOP 2	41,35		
DOP 3	38,39		
QAL 1	45,02	44,40	1,74
QAL 2	42,03		
QAL 3	46,15		

- *Cinzas*

A análise das cinzas foi realizada após a análise ao teor da humidade (**Figura 9**). Na **Tabela 18** estão apresentados os resultados obtidos. Pela análise dos resultados foi possível verificar que o queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR) foi o queijo com maior percentagem de cinzas e o queijo de ovelha curado da empresa Maratona de Delícias (QAL) apresentou a menor percentagem de cinzas entre os queijos analisados. Segundo o Caderno de Especificações do Queijo Serra da Estrela, a percentagem de cinzas em resíduo seco do queijo deveria estar entre 5 % e 6,5 %. Neste caso todos os queijos analisados em laboratório ultrapassaram este valor.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

Figura 9. Determinação do teor de cinzas em amostras de queijo Serra da Estrela DOP.

Tabela 18. Resultados dos ensaios para determinação das cinzas em queijos de ovelha curado: queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR), queijo de ovelha curado da Queijaria dos Lobos (QL), Queijo Serra da Estrela DOP da empresa Vale da Estrela (DOP) e queijo de ovelha curado da empresa Maratona de Delícias (QAL)

Amostra	% Cinzas	Média % cinzas	Desvio padrão
QPR 1	11,46	14,35	2,67
QPR 2	13,68		
QPR3	17,89		
QL 1	8,94	10,50	2,33
QL 2	13,79		
QL 3	8,77		
DOP 1	9,52	10,57	0,82
DOP 2	10,66		
DOP 3	11,54		
QAL 1	7,76	7,17	0,66
QAL 2	7,50		
QAL 3	6,25		

- *Atividade de água*

A análise da atividade de água (a_w) foi realizada após a receção dos queijos. Pela análise dos resultados obtidos (**Tabela 19**) foi possível verificar que a a_w não variou muito entre os queijos testados, tendo sido maior no queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR) e menor no Queijo Serra da Estrela DOP da empresa Vale da Estrela (DOP).

A atividade da água determina a quantidade de água disponível num alimento para crescimento de microrganismos. Quanto mais elevada for a atividade da água, mais rápido os microrganismos (como bactérias, leveduras e bolores) serão capazes de crescer. Assim, será

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

expectável que surjam mais rapidamente microrganismos no queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR) do que nos restantes.

Tabela 19. Resultados dos ensaios para determinação da atividade de água em queijos de ovelha curado: queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR), queijo de ovelha curado da Queijaria dos Lobos (QL), Queijo Serra da Estrela DOP da empresa Vale da Estrela (DOP) e queijo de ovelha curado da empresa Maratona de Delícias (QAL)

Amostra	a_w	Média a_w	Desvio-padrão
QPR 1	0,958	0,954	0,003
QPR 2	0,953		
QPR3	0,951		
QL 1	0,951	0,942	0,008
QL 2	0,932		
QL 3	0,942		
DOP 1	0,927	0,925	0,003
DOP 2	0,927		
DOP 3	0,920		
QAL 1	0,947	0,945	0,003
QAL 2	0,949		
QAL 3	0,946		

- *pH*

A análise do pH foi realizada um dia após a receção dos queijos. Na **Tabela 20** estão apresentados os resultados obtidos. Pela análise dos resultados apresentados verificou-se que os quatro queijos analisados têm um pH ácido. O pH mais ácido foi obtido para o queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR) e o menos ácido para o Queijo Serra da Estrela DOP da empresa Vale da Estrela (DOP) (**Tabela 20**).

Tabela 20. Resultados dos ensaios para determinação do pH em queijos de ovelha curado: queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR), queijo de ovelha curado da Queijaria dos Lobos (QL), Queijo Serra da Estrela DOP da empresa Vale da Estrela (DOP) e queijo de ovelha curado da empresa Maratona de Delícias (QAL)

Amostra	pH	Média pH	Desvio-padrão
QPR 1	5,49	5,48	0,01
QPR 2	5,47		
QPR3	5,48		
QL 1	5,84	5,82	0,01
QL 2	5,81		
QL 3	5,81		
DOP 1	6,06	5,97	0,07
DOP 2	5,92		
DOP 3	5,92		
QAL 1	5,77	5,78	0,01
QAL 2	5,79		
QAL 3	5,79		

- ***Acidez titulável***

A análise da acidez titulável foi realizada após a medição do pH. Pela análise da **Tabela 21** é possível verificar que a acidez titulável variou entre os diferentes queijos. O maior valor de acidez titulável foi obtido no queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR) e o menor no queijo de ovelha curado da Queijaria dos Lobos (QL).

Tabela 21. Resultados dos ensaios para determinação da acidez titulável em queijos de ovelha curado: queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR), queijo de ovelha curado da Queijaria dos Lobos (QL), Queijo Serra da Estrela DOP da empresa Vale da Estrela (DOP) e queijo de ovelha curado da empresa Maratona de Delícias (QAL)

Amostra	% Acidez titulável	Média % acidez titulável	Desvio-padrão
QPR 1	11,253	11,586	0,360
QPR 2	11,418		
QPR3	12,087		
QL 1	-	7,948	0,281
QL 2	7,667		
QL 3	8,230		
DOP 1	8,062	8,306	0,504
DOP 2	9,008		
DOP 3	7,848		
QAL 1	9,502	9,916	0,293
QAL 2	10,112		
QAL 3	10,136		

- *Textura*

Na **Tabela 22** são apresentados os dados de textura analisados nos quatro queijos em análise. Foram retiradas amostras de cada queijo e estas foram refrigeradas até 4 ˚C. Analisando os resultados é possível observar algumas diferenças entre as réplicas de cada queijo. Uma possível justificação é o facto de as amostras terem sido retiradas de partes diferentes no queijo, apesar de próximas.

Entre queijos, foi possível notar diferenças em algumas características analisadas, especialmente a dureza e a elasticidade. Na análise do queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR) obtiveram-se valores de dureza muito mais elevados do que nos restantes queijos e a elasticidade obtida neste queijo também foi a mais elevado entre os queijos (**Tabela 22**). A dureza é definida como a propriedade mecânica relaciona com a força necessária para obter a deformação de um produto ou uma dada penetração e a elasticidade é a propriedade mecânica relacionada com a rapidez de recuperação do material após a aplicação de uma força deformante e o modo como o material deformado volta à sua condição

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

inicial. Assim, o queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR) é mais difícil de deformar do que os restantes e é bastante elástico. Isto pode dever-se à pasta mais amanteigada que apresentava.

Tabela 22. Resultados dos ensaios para a análise da textura em queijos de ovelha curado: queijo de ovelha curado da Queijaria Artesanal Paulo Rogério (QPR), queijo de ovelha curado da Queijaria dos Lobos (QL), Queijo Serra da Estrela DOP da empresa Vale da Estrela (DOP) e queijo de ovelha curado da empresa Maratona de Delícias (QAL), usando as condições indicada anteriormente

Amostra	Dureza		Coesividade	Elasticidade	Adesividade
QPR 1	804,00	684,00	0,64	10,50	3,27
QPR 2	690,50	592,00	0,65	11,20	2,57
QPR3	627,00	553,50	0,69	10,90	3,06
QL 1	91,00	69,00	0,47	5,90	0,18
QL 2	71,00	54,50	0,55	6,00	0,31
QL 3	69,00	59,50	0,63	6,90	0,49
DOP 1	69,00	59,50	0,60	3,90	1,77
DOP 2	55,50	47,00	0,54	3,50	0,75
DOP 3	56,00	48,00	0,54	4,10	0,52
QAL 1	102,00	90,00	0,69	5,90	0,35
QAL 2	83,00	74,50	0,71	6,00	0,54
QAL 3	83,00	73,00	0,70	5,80	0,44

- *FTIR*

As amostras de queijo com certificação DOP foram comparadas por espectroscopia FTIR-MIR, para inferir da sua autenticidade e como técnica analítica complementar de garantia de genuinidade e qualidade destas.

Este estudo foi iniciado com a análise do queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP (empresa Vale de Estrela), cujo espectro de infravermelho é apresentado na **Figura 10**. Este espetro revelou um conjunto variado de bandas de várias intensidades que podem ser atribuídos a variados grupos funcionais. À semelhança do que foi realizado para a comparação dos queijos de diferentes origens e de forma a facilitar a interpretação do espectro, foram selecionadas 3 regiões discriminantes (I a III) (Karoui *et al*., 2005): a região I de 3000 a 2800 cm^{-1}; a região II de 1700 a 1500 cm^{-1} e a região III de 1500 a 500 cm^{-1}. Mais uma vez, a zona anterior à região I onde é possível observar uma banda larga em torno de 3300 cm^{-1} que corresponde a vibração *streching* O-H indicando a presença de água, não foi utilizada como fator discriminante devido à presença variável de água no queijo.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020 | PORTUGAL 2020 | UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

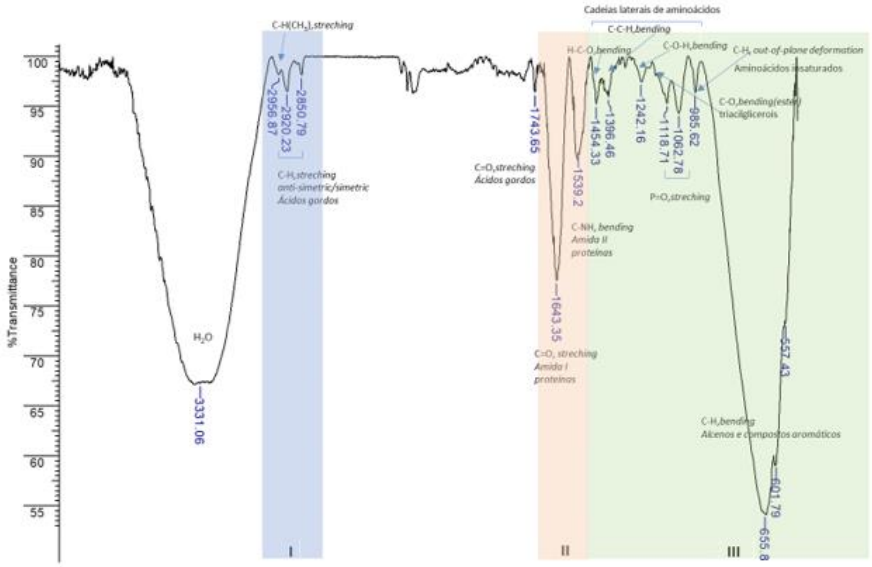

Figura 10. Espectro de infravermelho de amostra DOP1 (queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP (empresa Vale de Estrela). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.

Foi efetuada uma comparação do queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela com amostras de queijo da queijaria artesanal Paulo Rogério. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na **Figura 11** e na **Tabela 23**. Nestes resultados destacam-se apenas as zonas do espectro consideradas como discriminantes (região I a III). A análise do espectro de infravermelho (**Figura 11**) e respetiva tabela (**Tabela 23**) mostram que a diferença entre os espectros dos 2 queijos se centra na região III. Nesta zona III estas amostras distinguem-se nas bandas correspondentes às cadeias laterais de aminoácidos, nomeadamente entre 1170 e 1118 cm^{-1} onde se localizam vibrações C-O,bending(grupo ester),associado a triacilgliceróis. Constatou-se que, de um modo geral, os espectros dos 2 queijos são semelhantes, à exceção da pequena nova banda na zona de 1170 cm^{-1} descrita para o caso queijo da queijaria artesanal Paulo Rogério.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

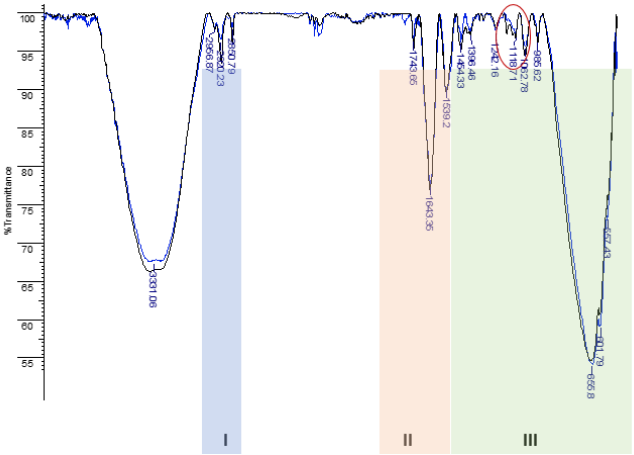

Figura 11. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela (azul) *vs.* queijo da queijaria artesanal Paulo Rogério (preto) Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.

Tabela 23. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs*. queijo da queijaria artesanal Paulo Rogério, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III (Woodcock *et al*., 2008)

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Queijo certificação DOP de Serra da Estrela da empresa Vale de Estrela	2965 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2920 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m,p*	1743cm^{-1} C=O,*stretching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1539 cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1396 cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1242cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1118 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p* 985cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation ,m*	A diferença entre os espectros dos queijos é na zona III, correspondendo a diferenças ao nível da presença de aminoácidos
Queijo certificação DOP da queijaria artesanal Paulo Rogério	2965 cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2920 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1743 cm^{-1} C=O,*streching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1539cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1396cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1170cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1118 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p* 985 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation ,m*	

[1]Intensidade de banda:p-pequena,m-média,g-grande

Adicionalmente foi analisada a amostra de queijo da queijaria dos Lobos e esta comparada com queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela. A comparação destas amostras está ilustrada na **Figura 12** e **Tabela 24**. Os resultados obtidos da comparação do espectro de infravermelho mostram que a diferença entre os espectros dos 2 queijos se centra na região I. Para a região I a banda de 2964 cm^{-1}, correspondentes ao modo C-H(CH3), *stretching*, atribuída à presença de ácidos gordos, é marcadamente mais larga para o queijo da queijaria dos Lobos, mostrando uma constituição um pouco diferente em termos do tipo de ácidos gordos. Conclui-se que, de um modo geral, as amostras são idênticas e que a pequena diferença existente entre as 2 amostras de queijo é

PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

nas bandas referenciadas para os grupos terminais dos ácidos gordos. Não se constata o aparecimento de novas bandas significativas na amostra do queijo da queijaria dos Lobos.

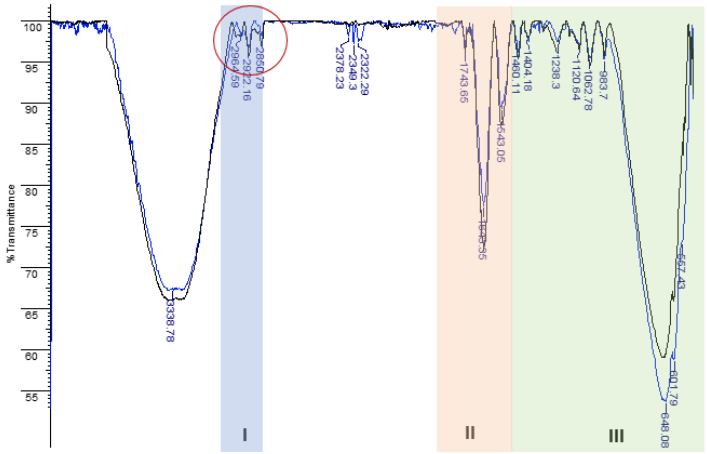

Figura 12. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela (azul) *vs*. queijo queijaria dos Lobos (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.

Tabela 24. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs*. queijo da queijaria dos Lobos, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III (Woodcock *et al*., 2008)

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Queijo certificação DOP de Serra da Estrela da empresa Vale de Estrela	2964cm^{-1} C-H(CH3),stretching,p 2922 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m,p*	1743cm^{-1} C=O,*stretching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1543 cm-1 C-NH, bending (Amida II), g	1460 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1404cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1238cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1120 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p* 983cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation, m*	A diferença entre os espectros dos queijos é na zona I, correspondendo a diferenças ao nível da presença de ácidos gordos
Queijo certificação DOP da queijaria dos Lobos	2964cm^{-1} C-H(CH3), stretching,larga,p 2922 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1743 cm^{-1} C=O,*streching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1543cm-1 C-NH, bending (Amida II), g	1460 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1404cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1238 cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1120 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p* 983 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation, m*	

[1]Intensidade de banda:p-pequena,m-média,g-grande

Ao nível da análise espectroscópica comparativa do queijo de certificação DOP da empresa Maratona de Delícias de Alvoco das Várzeas com o queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela, foram obtidos os resultados apresentados na **Figura 13** e **Tabela 25**. Foram detetadas diferenças entre os espectros dos 2 queijos, respeitantes à região III, fundamentalmente nas bandas 1174 cm^{-1} C-O,bending(ester), 1120 e

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

cm-1 P=O, *streching*, indicando diferenças nas cadeias de aminoácidos, triacilglicerois e compostos fosforados, respetivamente. Em suma, de um modo geral, as amostras são semelhantes, e a única diferença significativa foi encontrada para o queijo da empresa Maratona de Delícias de Alvoco das Várzeas no aparecimento da nova banda 1174 cm^{-1}, enquanto que para o queijo certificação DOP de Serra da Estrela da empresa Vale de Estrela a banda 1120 e cm^{-1} é muito mais intensa (**Figura 13**, **Tabela 25**).

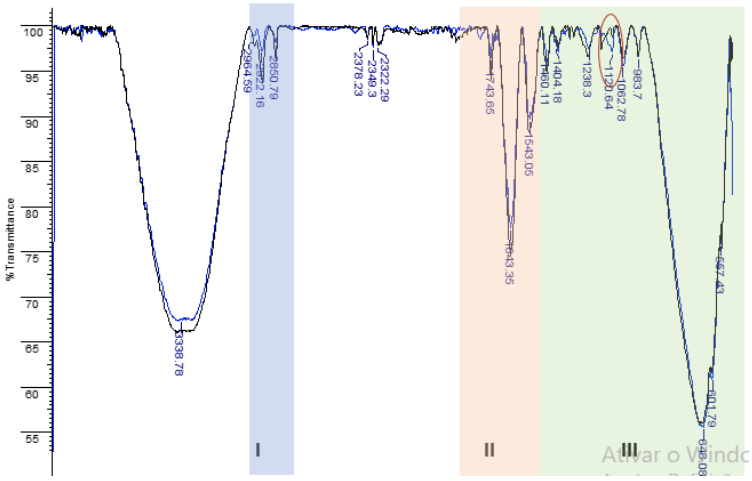

Figura 13. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela (azul) *vs*. queijo da empresa Maratona de Delícias de Alvoco das Várzeas (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.

Tabela 25. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs*. queijo da empresa Maratona de Delícias de Alvoco das Várzeas, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III (Woodcock *et al*., 2008)[1]

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Queijo certificação DOP de Serra da Estrela da empresa Vale de Estrela	2964cm^{-1} C-H(CH3), stretching,p 2922 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m,p*	1743cm^{-1} C=O,*stretching, m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1543 cm-1 C-NH, bending (Amida II), g	1460 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1404cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1238cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1120 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p* 983cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation, m*	A diferença entre os espectros dos queijos é na zona III, correspondendo a diferenças ao nível da presença de aminoácidos e triacilglicerois
Queijo certificação DOP empresa Maratona de Delícias de Alvoco das Várzeas	2964cm^{-1} C-H(CH3), stretching,larga,p 2922 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1743 cm^{-1} C=O,*streching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1543cm-1 C-NH, bending (Amida II), g	1460 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1404cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1238 cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1170cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1120 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p* 983 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation, m*	

[1]Intensidade de banda:p-pequena,m-média,g-grande

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

Para completar esta abordagem foram comparados espectroscopicamente as quatro amostras de certificação DOP (**Figura 14**). Esta comparação permitiu concluir que, de um modo geral, as amostras são semelhantes entre si, distinguindo-se pequenas diferenças na região I e III. Na região I a banda de 2964 cm^{-1} correspondente a modo C-H(CH3), *stretching*, atribuída à presença de ácidos gordos, é marcadamente mais larga para uma das amostras. Para a região III, observa-se pequenas diferenças de intensidade entre a as amostras e o aparecimento da nova banda pequena a 1174 cm^{-1} para algumas amostras, indicando diferenças nas cadeias de aminoácidos, triacilglicerois e compostos fosforados.

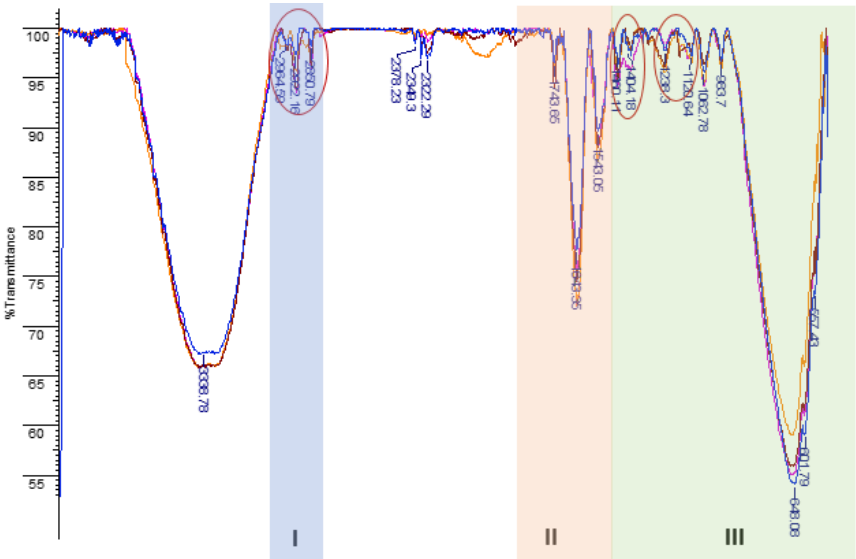

Figura 14. Comparação das amostras: Queijo Serra da Estrela DOP (azul); Queijo de ovelha curado (queijaria artesanal Paulo Rogério) (rosa); Queijo de ovelha curado (queijaria dos Lobos) (amarelo); Queijo de ovelha curado (empresa Maratona Delícias, Alvoco das Várzeas) (vermelho). Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.

Para além das análises espectroscópicas aos queijos de ovelha da região da Serra da Estrela de certificação DOP dos 4 produtores acima enunciados, foi efetuada uma análise comparativa de um destes queijos com queijo de mistura, queijo de vaca, queijo de cabra e queijo de ovelha da Serra da Estrela sem certificação DOP (analisados anteriormente), de forma a registar as zonas discriminantes e identificadoras de genuinidade. Assim, na **Figura 15** e **Tabela 26** são apresentados os resultados relativos à comparação da amostra de queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela com queijo de mistura, produzido através de leite de ovelha, cabra e vaca (Continente, SONAE). Na **Tabela 26**, destacam-se apenas as zonas do espectro consideradas como discriminantes (região I a III). Os resultados mostram que a diferença entre os espectros dos 2 queijos se centra na região I e III. Para a zona I observa-se como principal diferença a maior intensidade para o queijo de mistura

correspondente às bandas de 2920 e 2850 cm^{-1} correspondentes a C-H do metileno modo *streching* anti-simétrico e simétrico, respetivamente e também para a banda a 2956 cm^{-1} correspondente ao modo *streching* do C-H dos metilos terminais, relacionadas com a presença de ácidos gordos. No caso da zona III, a diferença centra-se em várias bandas, nomeadamente na intensa a 1174 cm-1 C-O,bending (ester), atribuída a presença de triacilglicerois, que no queijo de mistura está presente e no queijo ovelha Serra da Estrela de certificação DOP está ausente. As bandas de 1120 cm^{-1} C-O,bending(grupo ester) e 1060 cm^{-1} correspondentes ao grupo P=O de compostos fosforados, no queijo de mistura apresentam-se mais intensas do que no queijo ovelha Serra da Estrela de certificação DOP. Relativamente à banda 985 cm^{-1} sucede o oposto, correspondente ao modo C-H, *out-of-plane deformation*, indicando a presença de aminoácidos insaturados, sendo praticamente inexistente no queijo de mistura e mais intensa no queijo ovelha Serra da Estrela de certificação DOP. Constatou-se que, de um modo geral, para queijo ovelha Serra da Estrela de certificação DOP as bandas descritas são bastante menos intensas do que no caso do queijo de mistura. Verificou-se o aparecimento de nova banda a 1174 cm^{-1} na amostra de queijo de mistura e a banda a 985 cm^{-1} aparece apenas no queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP.

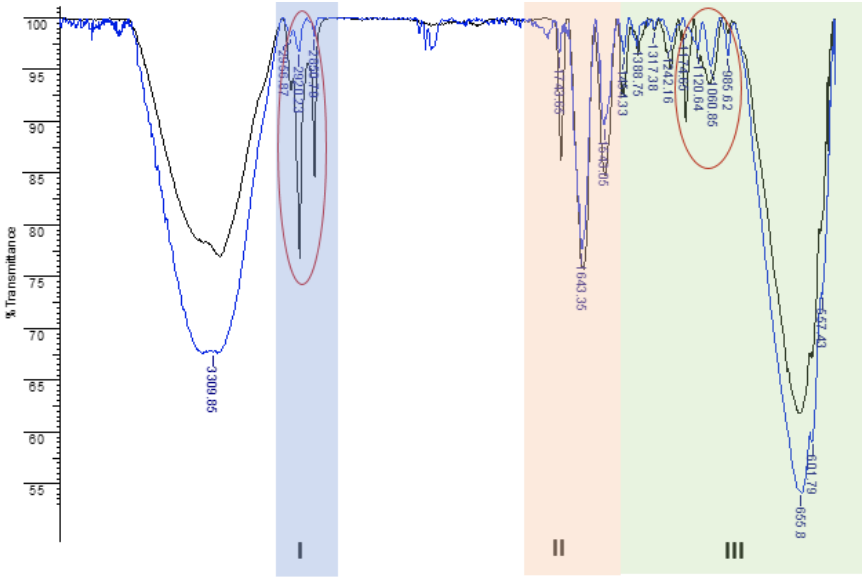

Figura 15. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela (azul) *vs.* queijo de mistura produzido através de leite de ovelha, cabra e vaca (Continente, SONAE) (preto) Azul-Região I; rosa- Região II; verde- Região III.

Tabela 26. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs.* queijo de mistura (Continente, SONAE), em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al*., 2008)

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Queijo certificação DOP de Serra da Estrela da empresa Vale de Estrela	2956 cm^{-1} C-H(CH3), stretching,p 2920 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1743 cm^{-1} C=O,*stretching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1543cm-1 C-NH, bending (Amida II), g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1388 cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1120 e 1060 cm^{-1} P=O,*streching,p* 985 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation, m*	A diferença entre os espectros dos queijos é na zona I e III, correspondendo a diferenças ao nível da presença de ácidos gordos, aminoácidos e compostos fosforados
Queijo de mistura (Continente, SONAE)	2956 cm^{-1} C-H(CH3), stretching,p 2920 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,g,g*	1743 cm^{-1} C=O,*streching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1543 cm-1 C-NH, bending (Amida II), g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,m* 1388 cm^{-1} C-C-H,*bending,m* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,m* 1174 cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1120 e 1060 cm^{-1} P=O,*streching,m*	

[1]Intensidade de banda:p-pequena,m-média,g-grande

A comparação da amostra de queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela com queijo de vaca (Queijos Tavares, S.A., região Seia) foi efetuada, destacando-se apenas nos resultados apresentados as zonas do espectro consideradas como discriminantes (região I a III) (**Figura 16**, **Tabela 27**). A análise do espectro de infravermelho (**Figura 16**) e respetiva tabela (**Tabela 27**) mostra que a diferença entre os espectros dos 2 queijos se centra na região I e III, sendo de um modo geral semelhante ao que sucede na comparação com o queijo de mistura, referido anteriormente. Para a zona I observa-se como principal diferença a maior intensidade para o queijo de vaca correspondente às bandas de 2920 e 2850 cm^{-1}, relacionadas com a presença de ácidos gordos. No caso da zona III, a diferença centra-se em várias bandas, nomeadamente na intensa a 1174 cm^{-1}, atribuída a presença de triacilglicerois, que no queijo de vaca está presente (à semelhança com o queijo de mistura) e no queijo ovelha Serra da Estrela de certificação DOP está ausente. A bandas de 1060 cm^{-1} correspondentes ao grupo P=O de compostos fosforados, no queijo de vaca apresenta-se menos intensa do que no queijo ovelha Serra da Estrela de certificação DOP. Relativamente à banda 985 cm^{-1} sucede o oposto, indicando a presença de aminoácidos insaturados, sendo praticamente inexistente no queijo de vaca e mais intensa no queijo ovelha Serra da Estrela de certificação DOP. Em suma, de um modo geral, para queijo ovelha Serra da Estrela de certificação DOP as bandas descritas são bastante menos intensas do que no caso do queijo de vaca. Verificou-se ainda o aparecimento de nova banda a 1174 cm^{-1} na amostra

de queijo de vaca e a banda a 985 cm^{-1} aparece apenas no queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP.

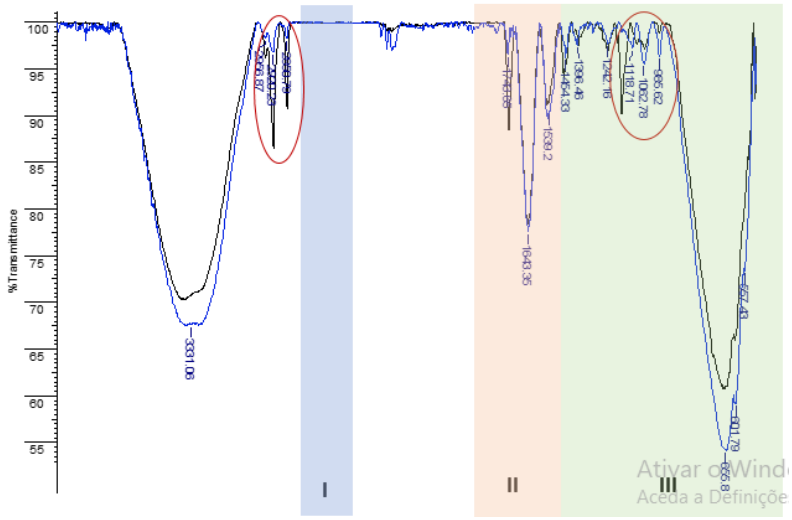

Figura 16. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela (azul) *vs.* queijo de vaca (Queijos Tavares, S.A., região Seia) (preto). Azul-Região I; rosa- Região II; verde-Região III.

Tabela 27. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs.* queijo de vaca (Queijos Tavares, S.A., região Seia), em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al*., 2008)

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Queijo certificação DOP de Serra da Estrela da empresa Vale de Estrela	2956 cm^{-1} C-H(CH3), stretching,p 2910 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1743 cm^{-1} C=O,*stretching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1539 cm-1 C-NH, bending (Amida II), g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1396 cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1118 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p* 985 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation, m*	A diferença entre os espectros dos queijos é na zona I e III, correspondendo a diferenças ao nível da presença de ácidos gordos, aminoácidos e compostos fosforados
Queijo de vaca De Queijos Tavares, S.A., região Seia	2956 cm^{-1} C-H(CH3), stretching,p 2920 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,g, g*	1743 cm^{-1} C=O,*streching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1539 cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,m* 1396 cm^{-1} C-C-H,*bending,m* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,m* 1174 cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1118 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,m* 985 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation,p*	

[1]Intensidade de banda:p-pequena,m-média,g-grande

A comparação da análise do queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela com amostras de queijo de cabra (Queijos Lagos, região de Seia) foi ainda estudada espectroscopicamente. Os resultados obtidos apenas considerando as zonas do espectro consideradas como discriminantes (região I a III) são apresentados na **Figura 17** e

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

Tabela 28. Foram detetadas diferenças entre os espectros dos 2 queijos, centrando-se estas na região I e III. Para a região I as bandas de 2956 a 2850 cm^{-1} correspondentes a modos C-H *streching*, atribuída à presença de ácidos gordos, são marcadamente mais intensas para o queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP. Na região III a diferença é fundamentalmente na banda 1174 cm^{-1} C-O,*bending*(ester), indicando presença de triacilglicerois, estando apenas presente para o caso do queijo de cabra. Concluiu-se que, de um modo geral, a diferença existente entre as 2 amostras de queijo, é que para queijo ovelha Serra da Estrela de certificação DOP as bandas descritas são bastante menos intensas do que no caso do queijo de cabra. Verificou-se o aparecimento de nova banda a 1174 cm^{-1} na amostra de queijo de cabra.

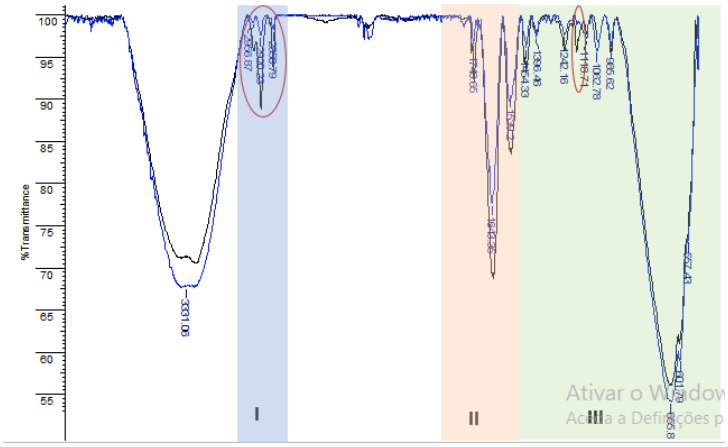

Figura 17. Comparação das amostras: ovelha Serra da Estrela de certificação DOP (azul) *vs.* queijo cabra (preto).

Tabela 28. Comparação das amostras: ovelha Serra da Estrela de certificação DOP *vs.* queijo de cabra, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al.*, 2008)

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Queijo certificação DOP de Serra da Estrela da empresa Vale de Estrela	2956 cm^{-1} C-H(CH3), stretching,p 2920 e 2850 cm^{-1} C-H *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1743 cm^{-1} C=O,*stretching,m* 1643cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1539 cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1396 cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1118 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p* 985 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation, m,m*	A diferença entre os espectros dos queijos é na zona I e III, correspondendo a diferenças ao nível de presença de ácidos gordos, aminoácidos insaturados e compostos fosfatados
Queijo de cabra (Queijos Lagos, região de Seia)	2956 cm^{-1} C-H(CH3), stretching,p 2920 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,p,p*	1743 cm^{-1} C=O,*streching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1539 cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,m* 1396cm^{-1} C-C-H,*bending,m* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,m* 1174 cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1118 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p,p* 985 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation,p*	

[1]Intensidade de banda: mp-muito pequena,p-pequena,m-média,g-grande

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

Para finalizar, foi comparado queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela com amostras de queijo de ovelha desta região, mas sem certificação DOP (Queijos Tavares, S.A., região de Seia). Os resultados obtidos são apresentados na **Figura 18** e na **Tabela 29**. Os resultados obtidos da comparação do espectro de infravermelho mostram que a diferença entre os espectros dos 2 queijos se centra na região III. Nesta região a diferença é fundamentalmente na banda 1174 cm^{-1} C-O,*bending*(ester), indicando diferenças em triacilglicerois. Concluiu-se que, de um modo geral, as amostras são semelhantes, e a única diferença significativa se encontra para o queijo de ovelha desta região não DOP (Queijos Tavares, S.A., região de Seia) no aparecimento da nova banda 1174 cm^{-1}, embora pouco intensa, enquanto que para o queijo certificação DOP de Serra da Estrela da empresa Vale de Estrela esta banda não existe.

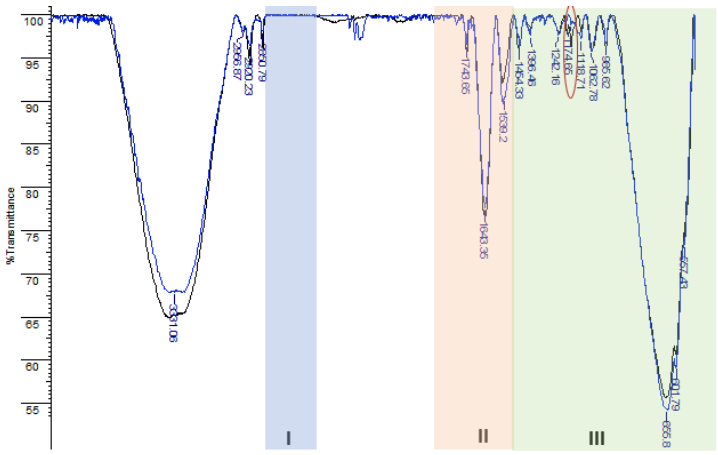

Figura 18. Comparação das amostras: ovelha Serra da Estrela de certificação DOP (azul) *vs.* queijo de ovelha desta região não DOP (Queijos Tavares, S.A., região de Seia) (preto).

Tabela 29. Comparação das amostras: queijo de ovelha Serra da Estrela de certificação DOP da empresa Vale de Estrela *vs*. queijo de ovelha desta região (Queijos Tavares, S.A., região de Seia) sem certificação DOP, em função das zonas discriminantes do espectro: Região I; Região II; Região III[1] (Woodcock *et al*., 2008)

Amostras	Região I	Região II	Região III	Observações
Queijo certificação DOP de Serra da Estrela da empresa Vale de Estrela	2956cm^{-1} C-H(CH3), stretching,p 2920 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m,p*	1743cm^{-1} C=O,*stretching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1539 cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1396cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1242cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1118 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p* 985cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation, m*	A diferença entre os espectros dos queijos é na zona III, correspondendo a diferenças ao nível da presença de triacilglicerois
Queijo do ovelha desta região (Queijos Tavares, S.A., região de Seia) sem certificação DOP	2956cm^{-1} C-H(CH3), stretching,larga,p 2920 e 2850 cm^{-1} *streching anti-simetric/simetric,m,m*	1743 cm^{-1} C=O,*streching,m* 1643 cm-1 C=O, stretching(Amida I),g 1539cm-1 C-NH, bending(Amida II),g	1454 cm^{-1} H-C-O,*bending,p* 1396cm^{-1} C-C-H,*bending,p* 1242 cm^{-1} C-O-H,*bending,p* 1174cm^{-1} C-O,*bending(ester),p* 1118 e 1062 cm^{-1} P=O,*streching,p* 985 cm^{-1} C-H, *out-of-plane deformation, m*	

[1]Intensidade de banda:p-pequena,m-média,g-grande

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

- ***Análise do perfil de aminoácidos em Queijo Serra da Estrela***

A pesquisa exaustiva do perfil de aminoácidos em Queijo Serra da Estrela teve por objetivo identificar os diferentes trabalhos já efetuados acerca da determinação dos aminoácidos presentes no Queijo Serra da Estrela, assim como, compreender a sua influência nas características do mesmo. Assim, efetuou-se uma revisão bibliográfica e um levantamento dos métodos utilizados para identificação e quantificação dos aminoácidos.

O queijo é um produto alimentar rico em ácidos gordos saturados. Em contrapartida, a proteólise ao longo do amadurecimento do queijo, leva à formação de substâncias como os aminoácidos (por exemplo, arginina, prolina, serina, asparagina, etc.), e estes desempenham um papel fundamental no sabor e nas características do queijo (Tavira *et al*., 1995). Além disso, os aminoácidos têm um elevado valor nutricional e elevada importância na avaliação da qualidade dos alimentos, sendo de extrema relevância os seus conteúdos relativos na proteína alimentar (Tessari *et al*., 2016).

Durante a proteólise, as proteínas são degradadas em produtos primários (polipeptídeos) e, subsequentemente, em produtos secundários, como peptídeos pequenos e médios e, eventualmente, aminoácidos livres. Da proteólise resultam substâncias que são importantes para o sabor ou que atuam como precursores do aroma. Acredita-se que a proteólise primária causa o amolecimento da textura do queijo no início do amadurecimento, por meio da rutura de sua matriz proteica tridimensional (Fox *et al*., 1993). A proteólise secundária gera peptídeos que são pequenos o suficiente para serem detetados pelos recetores de sabor humano.

Os produtos da proteólise podem servir como substratos para protéases e peptidases microbianas, que por sua vez levam a peptídeos menores e aminoácidos livres. Certos aminoácidos livres são extremamente importantes no desenvolvimento de sabores, como a Arginina que está relacionada com a amargura, enquanto a Prolina, a Serina e a Asparagina estão relacionadas com a doçura (Izco *et al*., 2000). A quantificação dos aminoácidos livres pode ser muito útil para queijos cuja maturação é acelerada, como forma de avaliar o seu efeito no sabor e na intensidade do aroma (Kosikowski *et al*., 1988). No entanto, a análise de aminoácidos livres pode ser problemática, especialmente devido ao alto conteúdo de proteínas e peptídeos. Assim, é necessário aplicar uma técnica de desproteinização eficaz antes da quantificação. Os métodos mais amplamente usados incluem precipitação ácida, ultrafiltração e precipitação com solventes orgânicos (Aristoy et al., 1991). Na precipitação ácida é usual utilizar concentrações de 2 a 12 % de ácido tricloroacético (TCA), 5% ácido

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

fosfotúngstico, 2,5 a 3,5% ácido sulfossalicílico, ácido perclórico (PCA) (Ali Qureshi *et al*., 1984), ácido pícrico (Reville *et al.*, 1978), sendo este último o precipitante mais discriminador. Já na ultrafiltração, método de desproteinização físico, são utilizadas membranas de corte e na precipitação com solventes orgânicos é utilizado acetonitrilo (Aristoy *et al*., 1991).

Vários métodos têm sido propostos para a análise dos aminoácidos, como a cromatografia de troca iónica, cromatografia líquida (HPLC), cromatografia gasosa (GC), eletroforese capilar, daí ser necessária a desproteinização (Sánchez-Machado *et al*., 2003; Jiménez-Martín *et al*., 2012). Geralmente, os aminoácidos são analisados após derivatização da amostra. Usualmente, o método usado é HPLC de fase reversa, com detetor UV visível, e os reagentes mais usados para derivatização são cloroformato de 9-fluorenilmetila, *orto*-ftalaldeído e isotiocianato de fenil (Sánchez-Machado *et al*., 2003) A cromatografia gasosa em conjunto com a espectrometria de massa (GC-MS) é um método simples, versátil e rápido e permite obter resultados com elevada resolução e reprodutibilidade. Os reagentes de derivatização utilizadas para a análise de GC-MS são BSTFA e MTBSTFA. No entanto, o reagente MSBSTFA produz um derivado mais estável do que o reagente BSTFA. O MTBSTFA é o segundo agente derivado mais amplamente utilizado na realização de GC-MS, e alguns autores recomendam o seu uso quando houver necessidade de procedimento de sililação de aminoácidos. (Sobolevsky *et al*., 2003; Jiménez-Martín *et al*., 2012).

Os perfis de aminoácidos juntamente com outros dados físico-químicos foram totalmente aplicados com sucesso, por exemplo, para distinguir entre queijos Grana Padano DOP e não DOP e Queijos Caciocavallo de amadurecimento longo DOP e não DOP. O mesmo estudo foi feito pelos autores Tavaria *et al*. (1995) e Reis Lima *et al*. (2019) com o queijo Serra da Estrela.

Na **Tabela 30** encontram-se discriminados os diferentes aminoácidos identificados por diferentes autores em queijo Serra da Estrela. Os autores Tavaria *et al*. (1995) prepararam as amostras pelo método Pico-Tag™ (Waters, Milford MA, EUA) e analisaram os aminoácidos por HPLC. Já os autores Reis Lima et al. (2019) prepararam as amostras com adição de acetonitrilo seguido de sonicação e análise por UPLC-DAD-MS/MS.

Tabela 30. Resumo dos aminoácidos livres identificados por diferentes autores

	Média ± desvio padrão	
Aminoácidos livres	**Reis Lima et al. (2019)***	**Tavaria et al. (1995)****
Histidina (His)	0,19 ± 0,09	4,39 ± 1,75
Leucina-Isoleucina (Leu-Ile)	40,00 ± 15,00	-

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

Lisina (Lys)	0,34 ± 0,30	12,93 ± 8,51
Metionina (Met)	1,10 ± 0,80	3,46 ± 2,51
Fenilalanina (Phe)	23,00 ± 10,00	33,38 ± 15,56
Treonina (Thr)	0,27 ± 0,19	-
Triptofano (Trp)	2,20 ± 1,70	21,22 ± 5,86
Valina (Val)	9,10 ± 5,10	64,97 ± 37,01
Alanina (Ala)	N.D.	4,83 ± 8,12
Arginina (Arg)	0,11 ± 0,07	-
Arginina + treonina (Arg+Thr)	-	9,91 ± 7,45
Asparagina (Asn)	24,00 ± 14,00	4,84 ± 2,57
Ácido aspártico (Asp)	0,79 ± 0,57	0,66 ± 0,59
Cisteína (Cys)	75,00 ± 27,00	32,56 ± 10,37
Cistina (Cys-Cys)	N.D.	-
Ácido Glutâmico (Glu)	2,00 ± 2,70	21,27 ± 5,62
Glutamina (Gln)	0,35 ± 0,41	10,32 ± 6,39
Glicina (Gly)	N.D.	6,48 ± 2,56
Prolina (Pro)	33,00 ± 12,00	7,34 ± 8,60
Tirosina (Tyr)	1,00 ± 1,40	4,29 ± 3,65
Serina (Ser)	0,52 ± 0,28	0,17 ± 0,11

*45 dias de maturação, média ± desvio padrão expressos em mg/100 g de matéria seca.
**35 dias de maturação, média ± desvio padrão expressos em mg/100 g de base húmida.
N.D. – Não detetado.

No estudo efetuado pelos autores Reis Lima *et al*. (2019) os aminoácidos livres foram detetados em baixas quantidades. A possibilidade de utilizá-los como variáveis discriminantes de origem também é interessante, embora os seus conteúdos sejam altamente dependentes do tempo de maturação, tipo de leite e procedimentos tecnológicos de produção. Já no estudo efetuado pelos autores Tavaria *et al*. (1995) os valores de aminoácidos livres detetados foram elevados, o que pode revelar uma forte atividade das protéases da microflora em desenvolvimento durante a maturação do queijo Serra da Estrela.

Os resultados obtidos pelos autores acima citados apontam que os perfis de aminoácidos juntamente com outros dados físico-químicos podem ser utilizados, no futuro, como uma ferramenta prática e precisa de autenticação de origem para os queijos Serra da Estrela.

De seguida são apresentadas diferentes propostas de procedimentos experimentais para a determinação de aminoácidos livres.

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020 | PORTUGAL 2020 | UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

Propostas de procedimentos experimentais

PROCEDIMENTO 1 - Determinação de aminoácidos livres (Jiménez-Martín *et al.*, 2012)

Reagente

- Ácido Clorídrico (HCl) → extração
- Acetonitrilo (C_2H_3N) → desproteinização e derivatização
- Padrão interno: DL-norleucina (5ng/ml)
- Diclorometano (CH_2Cl_2)
- MTBSTFA (N-Methyl-N-(tert-butyldimethylsilyl) trifluoroacetamide) → agente de derivatização

Extração de aminoácidos livres com solvente

- Moer 5 g de queijo.
- Homogeneizar as amostras por 4 min num Stomacher 400 (Lab-Blender, Barcelona, Espanha) com 25 mL de 0,1 M HCl.
- Transferir o conteúdo para um tubo de plástico e centrifugar a 10 000 rpm por 50 min a 4 °C.
- Filtrar os sobrenadantes com lã de vidro e armazenar a −80 °C até à análise.

Desproteinização dos aminoácidos livres

- Colocar 100 µL da solução filtrada em tubos cónicos.
- Em seguida, adicionar 250 µL de acetonitrila para desproteinizar as amostras.
- Centrifugar os tubos a 10 000 rpm durante 3 min a 4 °C.
- Em seguida, transferir 100 µL do sobrenadante para tubos de micro-centrífuga resistentes ao calor com tampas de rosca e adicionar 100 µL de uma solução de DL-norleucina (5 ng/mL) como padrão interno.
- Secar os tubos em vácuo speed modelo SVC200 (Savant, Barcelona, Espanha) acoplado a um coletor de condensação refrigerado modelo RT4104 (Savant) por 120 min. *(NOTA: evaporar a vácuo, temperatura ambiente parece ser importante.)*
- Remover a água residual adicionando 50 µL de diclorometano às amostras secas e usando o vácuo de velocidade novamente por 30 min. (*NOTA: Adicionar 0,5 ml de diclorometano e evaporar para assegurar completa remoção de água)*

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural
A Europa Investe nas Zonas Rurais

Derivatização da amostra

- Adicionar 50 µL do agente de derivatização (MTBSTFA) e 50 µL de acetonitrilo aos tubos secos, agitar manualmente.
- Incubar a 100 ° C por 60 min para induzir a reação de derivatização.
- Armazenar os tubos a -18 °C.

PROCEDIMENTO 2 - Análise de aminoácidos, ácidos gordos, aminas, ácidos orgânicos, e sacarídeos (Ochi *et al.*, 2012)

Reagentes

- Solução metanol/H_2O/$CHCl_3$ (2,5/1/1, v/v/v) → extração
- Ribitol → padrão interno
- Água Milli-Q
- Piridina → solvente
- Cloridrato de metoxiamina → 1º agente de derivatização
- MSTFA (N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) → 2º agente de derivatização

Extração de aminoácidos livres com solvente

- Congelar as amostras de queijo em nitrogénio líquido, moídas e, em seguida, liofilizar.
- Colocar 100 mg de queijo liofilizado em tubos Eppendorf de 2 mL e adicionar 1000 µL de metanol/H_2O/$CHCl_3$.
- Adicionar 60 µL de 0,2 mg/mL de ribitol, como um padrão interno e agitar no vórtex e sonicar durante 1,5 min por 3 vezes.
- Centrifugar a mistura a 16.000 × g, por 3 min a 4 °C e, em seguida, transferir 800 µL do sobrenadante para um tubo Eppendorf de 1,5 mL.
- Adicionar 400 µL de água Milli-Q e agitar a amostra num vórtex.
- Centrifugar a amostra a 16.000 × g, durante 3 min a 4 °C.
- Transferir 500 µL de sobrenadante para outro tubo Eppendorf de 1,5 mL e tampado. A seguir, perfurar a tampa e evaporar o extrato, para retirar o metanol, numa centrífuga concentradora a vácuo, à temperatura ambiente, por aproximadamente 2 h.
- Após evaporação, liofilizar o extrato num frasco de vidro à temperatura ambiente durante a noite.

Derivatização da amostra

- Adicionar 100 µL de cloridrato de metoxiamina em piridina (20 mg/mL) à amostra liofilizada acima, e incubar a mistura num Thermomixer Comfort (Eppendorf, Tóquio, Japão) a 30 ° C por 90 min para induzir a reação de metoxização.
- Adicionar 50 µL de MSTFA e a incubar a mistura a 37 ° C por 90 min para induzir a reação de sililação.

PROCEDIMENTO 3 - Determinação de aminoácidos livres (Reis Lima *et al*., 2019)

Reagentes

- Acetonitrilo/água (50:50) (v/v) → precipitante (solvente orgânico)
- N-acetilo-L-Tirosina → padrão interno

Extração dos aminoácidos livres e precipitação de proteínas

- Colocar 5 g de amostra em frascos contendo 10 ml de água/acetonitrilo e 3,0 mM de padrão interno.
- Agitar a mistura em vórtex durante 5 minutos a 500 rpm.
- Sonicar durante 10 minutos à temperatura ambiente (20 °C).
- Centrifugar as amostras a 4 °C e 10 000 rpm durante 10 min.
- Filtrar o sobrenadante em vácuo com uma membrana de filtro de nylon de 0,2 µm e armazenar a -4 °C.

Derivatização da amostra

NOTA: Adicionar 0,5 ml de diclorometano e evaporar para assegurar completa remoção de água

PROCEDIMENTO 4 - Determinação de aminoácidos livres (Izco *et al*., 2000)

Reagentes

- Ácido Clorídrico 0,1 M (HCl) → extração
- Sulfona de metionina 0,4 mM → padrão interno
- Ácido tricloroacético (40%) → desproteinização
- Trielilamina-metanol-1 M acetato de sódio, 1:2:2 (v/v/v)
- Metanol-água-trietilamina-fenilisotiocianato, 7:1:1:1 (v/v) → agente de derivatização

Extração de aminoácidos livres com solvente

- Colocar 1 g de amostra em 10 ml de HCl contendo sulfona de metionina.
- Homogeneizar a mistura usando ultraturrax e sonicar em ultrassons por 20 minutos.
- Centrifugar a 3000 g por 10 minutos.

Desproteinização dos aminoácidos livres

- Diluir (1:1, v/v) 500 µl do sobrenadante obtido anteriormente em ácido tricloroacético (40%).
- Deixar reagir durante 10 min a 0-4 °C.
- Centrifugar a 20000 g por 10 min.
- Secar a vácuo 25 µl do sobrenadante.
- Adicionar 20 µl de trielilamina-metanol-1 M acetato de sódio à amostra seca e secar a vácuo novamente.

Derivatização da amostra

- Adicionar 20 µl de solução de derivatização e incubar durante 10 min à temperatura ambiente e secar a vácuo. É adicionada à amostra seca e esta é seca de novo.
- Suspender as amostras em 100 µl de solução Pico-tag.
- Filtrar a amostra por um filtro hidrofílico tipo-HV.

NOTA: Adicionar 0,5 ml de diclorometano e evaporar para assegurar completa remoção de água.

- ***Análise do perfil de gordura no queijo Serra da Estrela***

O queijo Serra da Estrela é produzido a partir de leite cru de ovelha das raças autóctones portuguesas 'Churra Mondegueira' e 'Bordaleira Serra da Estrela' e coagulado a partir da flor de cardo selvagem (*Cynara cardunculus* L.), durante um período limitado (geralmente de dezembro a maio). Muitos fatores podem afetar a composição do leite, incluindo clima, estado nutricional e fisiológico do rebanho, bem como o estágio de lactação, que por sua vez influenciam as características finais do queijo.

Correia *et al*. (2016) mostraram que o ecótipo do cardo influencia a cor, textura e características sensoriais dos queijos Serra da Estrela. Outros autores, estudaram o perfil de ácidos gordos e como ele é influenciado por diferentes fatores, tais como tempo de maturação, época de fabricação do queijo, tempo de armazenamento, diferentes tratamentos

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

de funcionalização do queijo ou mesmo devido à suplementação de ração de ovinos. (Partidária *et al*., 1998; Reis Lima et al., 2020).

Na **Tabela 31** encontram-se discriminados os diferentes ácidos gordos identificados por diferentes autores em queijo Serra da Estrela.

Tabela 31. Resumo dos ácidos gordos identificados por diferentes autores

	Quantidade média ± desvio padrão (%)		
Ácidos gordos	**Reis Lima et al. (2019)**	**Carocho et al. (2015)**	**Carocho et al. (2016)**
$C_{4:0}$ (ácido butírico)	4,3 ± 1,4	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,1
$C_{6:0}$ (ácido capróico)	3,6 ± 1,0	2,6 ± 0,1	2,6 ± 0,2
$C_{8:0}$ (ácido caprílico)	3,2 ± 0,9	2,4 ± 0,05	2,6 ± 0,3
$C_{10:0}$ (ácido cáprico)	8,6 ± 2,2	6,9 ± 0,1	8 ± 1
$C_{11:0}$ (ácido undecanóico)	0,10 ± 0,04	-	-
$C_{12:0}$ (ácido láurico)	5,2 ± 1,1	4,3 ± 0,1	5 ± 1
$C_{13:0}$ (ácido tridecanóico)	0,09 ± 0,02	-	-
$C_{14:0}$ (ácido mirístico)	11,4 ± 1,3	10,6 ± 0,1	11 ± 1
$C_{14:1}$ (ácido miristoleico)	0,30 ± 0,14	-	-
$C_{15:0}$ (ácido pentadecanóico)	1,0 ± 0,2	-	1,4 ± 0,2
$C_{16:0}$ (ácido palmítico)	23,9 ± 1,9	23,3 ± 0,2	25 ± 2
$C_{16:1}$ (ácido palmitoleico)	0,8 ± 0,2	-	1,0 ± 0,1
$C_{17:0}$ (ácido heptadecanóico)	0,7 ± 0,1	-	1,0 ± 0,1
$C_{18:0}$ (ácido esteárico)	10,8 ± 1,8	11,5 ± 0,3	11 ± 1
$C_{18:1n9c}$ (ácido oleico)	19,1 ± 3,8	26,4 ± 0,2	-
$C_{18:2n6t}$ (ácido linoleico trans-isomero)	1,4 ±0,5	-	-
$C_{18:2n6c}$ (ácido linoleico)	3,1 ± 0,5	2,60 ± 0,04	-
$C_{18:3n3}$ (ácido α-linoleico)	1,5 ± 0,4	-	-
$C_{20:0}$ (ácido araquídico)	0,23 ± 0,06	-	-
$C_{20:1}$ (ácido gondoico)	0,09 ± 0,05	-	-
$C_{21:0}$ (ácido heneicosanoico)	0,07 ± 0,05	-	-
$C_{20:4n6}$ (ácido araquidónico)	0,3 ± 0,1	-	-
$C_{22:0}$ (ácido docosanóico)	0,11 ± 0,06	-	-

PDR 2020 PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO RURAL 2014·2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu Agrícola de Desenvolvimento Rural A Europa Investe nas Zonas Rurais

Bibliografia

Abdel-Rahman, S. & Ahmed, M. (2007). Rapid and sensitive identification of buffalo's, cattle's and sheep's milk using species-specific PCR and PCR–RFLP techniques. *Food Control*, *18*, 1246–1249.

Ali Qureshi, G., Fohlin, L., Bergström, J. (1984) Application of High-Performance Liquid Chromatography to the determination of free amino acids in physiological fluids. J. Chromatogr. A, 297, 91–100. doi: 10.1016/S0021-9673(01)89032-4.

Aristoy, M. & Toldrá, F. (1991). Deproteinization Techniques for HPLC Amino Acid Analysis in Fresh Pork Muscle and Dry-Cured Ham. J. Agric. Food Chem., 39, 1792–1795.

Bakircioglu, D., Kurtulus, Y. B., & Ucar, G. (2011). Determination of some traces metal levels in cheese samples packaged in plastic and tin containers by ICP-OES after dry, wet and microwave digestion. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(1), 202–207. https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.10.017

Bintsis, T., Angelidis, A. S., & Psoni, L. (2008). Modern Laboratory Practices – Analysis of Dairy Products. In T. J. Britz & R. K. Robinson (Eds.), *Advanced Dairy Science and Technology* (pp. 183–261). Blackwell Publishing Ltd.

Borková, M., & Snášelová, J. (2005). Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products - A review. *Czech Journal of Food Sciences*, *23*, 41–50.

Boss, C. B., & Fredeen, K. J. (2004). Concepts,Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy. In *Emission Spectroscopy* (3rd ed.). PerkinElmer, Inc. All.

Bottero, M. T., Civera, T., Nucera, D., Rosati, S., Sacchi, P., & Turi, R. M. (2003). A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheep's milk in dairy products. *International Dairy Journal*, *13*(4), 277–282. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00170-X

Carocho, M., Barreira, J., Antonio, A., Bento, A., Morales, P., Ferreira, I. (2015). The incorporation of plant materials in 'Serra da Estrela' cheese improves antioxidant activity without changing the fatty acid profile and visual appearance. J. Lipid Sci. Technol., 1607–1614. doi: 10.1002/ejlt.201500018.

Carocho, M., Barreira, J., Bento, A., Fernández-ruiz, V., Morales, P., Ferreira, I. (2016) Chestnut

and lemon balm based ingredients as natural preserving agents of the nutritional profile in matured ‘‘ Serra da Estrela ” cheese. Food Chem., 204, 185–193. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.02.136.

Coni, E., Bocca, A., Coppolelli, P., Caroli, S., Cavallucci, C., & Marinucci, M. T. (1996). Minor and trace element content in sheep and goat milk and dairy products. *Food Chemistry*, *57*(2), 253–260. https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00216-2

Correia, P., Vítor, P., Tenreiro, A., Correia, M., Madanelo, A., JGuiné, R. (2016) Effect of different thistle flower ecotypes as milk-clotting in Serra da Estrela cheese. Nutr. Food Sci., 46(4), 458–475. doi: 10.1108/NFS-12-2015-0157.

Costa, N., Ravasco, F., Miranda, R., Duthoit, M., & Roseiro, L. B. (2008). Evaluation of a commercial ELISA method for the quantitative detection of goat and cow milk in ewe milk and cheese. *Small Ruminant Research*, *79*(1), 73–79.

Cottenet, G., Blancpain, C., & Golay, P. A. (2011). Simultaneous detection of cow and buffalo species in milk from China, India, and Pakistan using multiplex real-time PCR. *Journal of Dairy Science*, *94*(8), 3787–3793. https://doi.org/10.3168/jds.2011-4195

Csikos, A., Hodzic, A., Pasic-Juhas, E., Javor, A., Hrković-Porobija, A., Goletic, T., Gulyas, G., & Czegledi, L. (2016). Applicability and sensitivity of PCR-SSCP method for milk species identification in cheese. *Acta Alimentaria*, *45*(1), 69–76. https://doi.org/10.1556/066.2016.45.1.9

Cunha, J. T., & Domingues, L. (2017). RAPD/SCAR Approaches for Identification of Adulterant Breeds’ Milk in Dairy Products. In L. Domingues (Ed.), *PCR: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (1st ed., Vol. 1620, pp. 183–193). Springer Science+Business Media LLC. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7060-5

De, S., Brahma, B., Polley, S., Mukherjee, A., Banerjee, D., Gohaina, M., Singh, K. P., Singh, R., Datta, T. K., & Goswami, S. L. (2011). Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. *Food Control*, *22*(5), 690–696. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.026

Dias, C., & Mendes, L. (2018). Protected Designation of Origin (PDO), Protected Geographical Indication (PGI) and Traditional Speciality Guaranteed (TSG): A bibiliometric analysis. *Food Research International*, *103*, 492–508.

Dogan, İ., & Dogan, N. (2017). Statistical Tests for Neutrality: Review. *Turkiye Klinikleri Journal*

of Biostatistics, *9*(2), 167–174. https://doi.org/10.5336/biostatic.2016-53446

Dvorak, L., Mlcek, J., & Sustova, K. (2016). Comparison of FT-NIR spectroscopy and ELISA for detection of adulteration of goat cheeses with cow's milk. *Journal of AOAC International*, *99*(1), 180–186.

Dufour, E., Mazerolles, G., Devaux, M., Duboz, G., Duployer, M., Mouhous Riou, N. (2000). Phase transition of triglycerides during semi-hard cheese ripening, International Dairy Journal (2000), 10, 81-93.

Ferreira, I. & Caçote, H. (2003). Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins. Journal of Chromatography A, 1015(1–2), 111–118.

Fox, P., Law, J., McSweeney, P., Wallace, J. (1993) Biochemistry of Cheese Ripening. Cheese Chem. Phys. Microbiol., 2.

Golinelli, L. P., Carvalho, A. C., Casaes, R. S., Lopes, C. S. C., Deliza, R., Paschoalin, V. M. F., & Silva, J. T. (2014). Sensory analysis and species-specific PCR detect bovine milk adulteration of frescal (fresh) goat cheese. *Journal of Dairy Science*, *97*(11), 6693–6699. https://doi.org/10.3168/jds.2014-7990

González-Martín, I., Hernández-Hierro, J. M., Revilla, I., Vivar-Quintana, A., Lobos-Ortega, I., & González-Pérez, C. (2009). Changes in the mineral content in cheeses of different compositions during 6 months of ripening. *Czech Journal of Food Sciences*, *27*(SPEC. ISS.). https://doi.org/10.17221/1086-cjfs

Guo, L., Qian, J. P., Guo, Y. S., Hai, X., Liu, G. Q., Luo, J. X., & Ya, M. (2018). Simultaneous Identification of Bovine and Equine DNA in Milks and Dairy Products Inferred from Triplex Taq Man Real-Time PCR Technique. *J. Dairy Sci.*, *101*(8), 6776–6786.

Ochi, H., Naito, H., Iwatsuki, K., Bamba, T., Fukusaki, E. (2012) Metabolomics-based component profiling of hard and semi-hard natural cheeses with gas chromatography/time-of-flight-mass spectrometry, and its application to sensory predictive modeling. J. Biosci. Bioeng., 113(6), 751–758. doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.02.006.

Hiendleder, S., Mainz, K., Plante, Y., & Lewalski, H. (1998). Analysis ofmitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources. No evidence for contributions from urial and argali sheep. *J. Hered.*, *89*, 113–120.

Halket, J. & Zaikin, K. (2003) Derivatization in mass spectrometry - 1. Silylation. Eur. J. Mass Spectrom., 1–21. doi: 10.1255/ejms.527.

Izco, J., Irigoyen, A., Torre, P., Barcina, Y. (2000) Effect of the activity levels of the added proteolytic enzyme mixture on free amino acids in ripening Ossau-Iraty cheese. J. Chromatogr. *A*, 881, 69–79. doi: 10.1016/S0021-9673(00)00285-5.

Izco, J. & Torre, P. (2000). Characterisation of volatile flavour compounds in Roncal cheese extracted by the 'purge and trap' method and analysed by GC-MS," Food Chem., 70(3), 409–417. doi: 10.1016/S0308-8146(00)00100-X.

Jiménez-Martín, E., Ruiz, J., Pérez-Palacios, T., Silva, A. and Antequera, T. (2012) Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for the Determination of Free Amino Acids as Their Dimethyl- tert -butylsilyl (TBDMS) Derivatives in Animal Source Food. J. Agric. Food Chem., 60(10), 2456–2463. doi: 10.1021/jf2052338.

Karoui, R., Dufour, E., Pillonel, L., Schaller, E., Picque, D., Cattenoz, T., J Bosset, J. (2005). The potential of combined infrared and fluorescence spectroscopies as a method of determination of the geographic origin of Emmental cheeses, International Dairy Journal, 15, 287–298

Karoui, R., Mazerolles, G., Bosset, J., Baerdemaeker, J., Dufour, E. (2007). Utilisation of mid-infrared spectroscopy for determination of the geographic origin of Gruye`re PDO and L'Etivaz PDO Swiss cheeses, Food Chemistry, 105, 847–854.

Karoui, R., Dufour, E., Pillonel, L., Picque, D., Cattenoz, T., Bosset, J. (2004). *D*etermining the geographic origin of Emmental cheeses produced during winter and summer using a technique based on the concatenation of MIR and fluorescence spectroscopic data, Eur Food Res Technol, 219:184–189

Karoui, R., Bosset, J., Mazerolles, G., Kulmyrzaeva, A., Dufour, E. (2005). Monitoring the geographic origin of both experimental FrenchJura hard cheeses and Swiss Gruye`re and L'Etivaz PDO cheeses using mid-infrared and fluorescence spectroscopies: a preliminary investigation, International Dairy Journal, 15, 275–286.

Kira, C. & Maihara, V. (2007). Determination of major and minor elements in dairy products through inductively coupled plasma optical emission spectrometry after wet partial digestion and neutron activation analysis. *Food Chemistry*, *100*(1), 390–395. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.014

Kosikowski, F. (1988). Enzyme Behavior and Utilization in Dairy Technology. J. Dairy Sci.,. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(88)79592-2.

Lante, A., Lomolino, G., Cagnin, M., & Spettoli, P. (2006). Content and characterisation of minerals in milk and in Crescenza and Squacquerone Italian fresh cheeses by ICP-OES. *Food Control*, *17*(3), 229–233. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.10.010

Levkov, V., Stafilov, T., Pacinovski, N., Bačeva, K., Mateva, N., & Gjorgovska, N. (2017). Content of major and trace elements in raw ewes ' milk used for production of traditional white brined cheese. *Slovak Journal of Animal Science*, *2017*(1), 7–14.

Lipkin, E., Shalom, A., Khatib, H., Soller, M., & Friedmann, A. (1993). Milk as a source of deoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerase chain reaction. *J Dairy Sci*, *76*, 2025–2032.

López-Calleja, I., González Alonso, I., Fajardo, V., Rodríguez, M. A., Hernández, P. E., García, T., & Martín, R. (2005). PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese. *International Dairy Journal*, *15*, 1122–1129.

Manuelian, C. L., Currò, S., Penasa, M., Cassandro, M., & De Marchi, M. (2017). Characterization of major and trace minerals, fatty acid composition, and cholesterol content of Protected Designation of Origin cheeses. *Journal of Dairy Science*, *100*(5), 3384–3395. https://doi.org/10.3168/jds.2016-12059

Mayer, H. K. (2005). Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *Int. Dairy J.*, *15*, 595–604.

Mazerolles, G., Devaux, M-F., Duboz, G., Duployer, M., Riou, N., Dufour, E. (2001). Infrared and fluorescence spectroscopy for monitoring protein structure and interaction changes during cheese ripening. Lait, 81, 509–527

Miloradovic, Z., Miocinovic, J., Kljajevic, N., Tomasevic, I., & Pudja, P. (2018). The influence of milk heat treatment on composition, texture, colour and sensory characteristics of cows' and goats' Quark-type cheeses. *Smal Ruminant Research.*, *169*, 154–159.

Partidário, M., Barbosa, M. and Boas, L. (1998). Free fatty acids, triglycerides and volatile compounds in Serra da Estrela cheese - Changes throughout ripening. Int. Dairy J., 8(10-11), 873–881. doi: 10.1016/S0958-6946(98)00131-9.

Pascoal, A., Prado, M., Calo, P., Cepeda, A., & Barros-Velázquez, J. (2005). Detection of bovine

DNA in raw and heat-processed foodstuffs, commercial foods and specific risk materials by a novel specific polymerase chain reaction method. *Eur. Food Res. Technol.*, *220*, 444–450.

Pedrosa, S., Arranz, J., Brito, N., Renseigné, N., San, F., Bayón, Y., Pedrosa, S., Arranz, J., Brito, N., Renseigné, N., & Primitivo, F. S. (2007). Mitochondrial diversity and the origin of Iberian sheep. *Genetics Selection Evolution, BioMed Central*, *39*(1), 91–103.

Rentsch, J., Weibel, S., Ruf, J., Eugster, A., Beck, K., & Köppel, R. (2013). Interlaboratory validation of two multiplex quantitative real-time PCR methods to determine species DNA of cow, sheep and goat as a measure of milk proportions in cheese. *European Food Research and Technology*, *236*(1), 217–227. https://doi.org/10.1007/s00217-012-1880-y

Reis Lima, M. *et al.* (2019). Serra da Estrela cheese's free amino acids profiles by UPLC-DAD-MS/MS and their application for cheese origin assessment. Food Res. Int., 126. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108729.

Reis Lima, M. *et al.* (2019) Assessing Serra da Estrela PDO cheeses' origin-production date using fatty acids profiles. J. Food Meas. Charact., 13(4), 2988–2997. doi: 10.1007/s11694-019-00219-z.

Reis Lima, M. *et al*. (2020). Fatty acids profile of Serra da Estrela PDO cheeses and respective atherogenic and thrombogenic indices. Nutr. Food Sci., 50(3), 417–432, 2020, doi: 10.1108/NFS-06-2019-0178.

Reville, W. & Fox, P. (1978). Soluble Protein in Cheddar Cheese: A Comparison of Analytical Methods. Irish J. Food Sci. Technol., 2, 67–76.

Ribani, A., Schiavo, G., Utzeri, V. J., Bertolini, F., Geraci, C., Bovo, S., & Fontanesi, L. (2018). Application of next generation semiconductor based sequencing for species identification in dairy products. *Food Chemistry*, *246*, 90–98. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.006

Sánchez-Machado, D, López-Cervantes, J., Lópes-Hernández, J., Paserio-Losada, P. Simal-Lozano, J. (2003). High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Amino Acids in Edible Seaweeds after Derivatization with Phenyl Isothiocyanate. Chromatographia, 58, 159–163. doi: 10.1365/s10337-003-0031-9.

Sobolevsky, T., Revelsky, A., Miller, B., Oriedo, V., Chernetsova, E., Revelsky, A. (2003) Comparison of silylation and esterification/acylation procedures in GC-MS analysis of

amino acids. J. Sep. Sci., 26, 1474–1478, 2003. doi: 10.1002/jssc.200301492.

Schoenfuss, T. C., Metz, Z. P., Pataky, A. E., & Schoenfuss, H. L. (2014). Technical note: The equivalency of sodium results in cheese digested by either dry ashing or microwave-accelerated digestion. *Journal of Dairy Science*, *97*(2), 710–714. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7420

Tavaria, F., Franco, I., Carballo, F., Malcata, F. (1995) Amino acid and soluble nitrogen evolution throughout ripening of Serra da Estrela cheese.

Tessari, P., Lante, A., Mosca, G. Essential amino acids: Master regulators of nutrition and environmental footprint? Sci. Rep., 6,1–13. doi: 10.1038/srep26074

Wood, N. J., & Phua, S. H. (1996). Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. Animal Genetics, 27, 25–33.

Woodcock, T. et al. (2008). Application of Near and Mid-Infrared Spectroscopy to Determine Cheese Quality and Authenticity. Food Bioprocess Technol., 1,117–129

Zarei, M., Maktabi, S., Yousefvand, A., & Tajbakhsh, S. (2016). Fraud identification of undeclared milk species in composition of sheep yogurt and cheese using multiplex PCR assay. Journal of Food Quality and Hazards Control, 3, 15–19.