

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES**  
**URI ERECHIM**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**GLACIELA CRISTINA RODRIGUES DA SILVA SCHERER**

**DESENVOLVIMENTO DE TOFUS ELABORADOS COM EXTRATO  
HIDROSSOLÚVEL DE SOJA DAS CULTIVARES BRS 267 E VMAX COM  
COAGULANTE FLOR DO CARDO (CYNARA CARDUNCULUS L.)**

**ERECHIM, RS – BRASIL**  
**ABRIL, 2021**

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES**  
**URI ERECHIM**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE TOFUS ELABORADOS COM EXTRATO  
HIDROSSOLÚVEL DE SOJA DAS CULTIVARES BRS 267 E VMAX COM  
COAGULANTE FLOR DO CARDO (CYNARA CARDUNCULUS L.)**

Glaciela Cristina Rodrigues Da Silva Scherer

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos, Área de concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

**ERECHIM, RS – BRASIL**

**ABRIL, 2021**

**DESENVOLVIMENTO DE TOFUS ELABORADOS COM EXTRATO  
HIDROSSOLÚVEL DE SOJA DAS CULTIVARES BRS 267 E VMAX COM  
COAGULANTE FLOR DO CARDO (CYNARA CARDUNCULUS L.)**

Glaciela Cristina Rodrigues Da Silva Scherer

Tese de doutorado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

---

Prof. Dra. Juliana Steffens  
Orientadora (URI-Erechim)

---

Prof. Dra. Jamile Zeni  
Orientadora (URI-Erechim)

---

Pesquisadora Dra. Mercedes Concordia Carrão-Panizzi  
Orientadora (Embrapa Trigo-Passo Fundo)

---

Prof. Dra. Darlene Cavalheiro  
Banca (UDESC-Pinhalzinho)

---

Prof. Dra. Marlice Bonacina  
Banca (IFRS-Erechim)

---

Prof. Dra. Rosicler Colet  
Banca (URI-Erechim)

---

Prof. Dra. Eunice Valduga,  
Banca (URI-Erechim)

**Erechim, abril de 2021**

S326d Scherer, Glaciela Cristina Rodrigues da Silva

Desenvolvimento de tofus elaborados com extrato hidrossolúvel de soja das cultivares BRS 267 e Vmax com coagulante flor do cardo (*Cynara cardunculus* L.) / Glaciela Cristina Rodrigues da Silva Scherer . – 2021. 122 f.

Tese (doutorado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai Uruguai e das Missões, Erechim, 2021.

“Orientação: Profa. Dra Juliana Steffens, Profa Dra Jamile Zeni, Profa Dra Mercedes Concordia Carrão-Panizzi. ”

1. Queijo vegano 2. Coagulante natural 3. Bioatividade 4. Tofu I. Título

C.D.U.: 664

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela benção da vida, por possibilitar este momento e por colocar em meu caminho pessoas especiais.

À minha família, Edimar, Bruno e Tailine, que precisaram se adaptar a viver com a minha distância, que entenderam os meus sonhos, e que me apoiaram com amor e dedicação. Vocês que acompanharam as alegrias, as lutas, as buscas e a ausência da mente, meu eterno agradecimento.

À minha mãe pelo exemplo de persistência e humildade, meu agradecimento.

À minha irmã Fabiane, que em momentos de minha ausência, fez a diferença nos cuidados com meus filhos, muito obrigada é pouco. Te agradeço por proporcionar conviver com a pequena Haiana, ela deixa os dias mais coloridos.

À minha amiga Janine, obrigada pela amizade, pelas conversas, pela companhia de estudo e pelos momentos de descontração. Os verdadeiros amigos são revelados em momentos difíceis e são como anjos que Deus coloca em nossa vida. Obrigada por tudo!

À minha orientadora Dra. Juliana Steffens, pela confiança, pelas sugestões, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela disponibilidade durante todo o doutorado e principalmente pela amizade. Obrigada pelo sorriso e o apoio que transmitia em cada encontro.

À Dra. Jamile Zeni, pela orientação, pelas sugestões e pela ajuda de sempre.

À Dra. Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi pela orientação e por disponibilizar insumos para realização da tese.

Aos membros da banca, pelas valiosas sugestões na conclusão deste trabalho. À Dra. Clarisse Steffens, ao Dr. Rogério Cansian e à Dra. Eunice Valduga, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho. À Dra. Rosicler Colet pelo auxílio nas análises, especialmente pela colaboração nas análises microbiológicas. À Dra. Darlene Cavalheiro pela colaboração na avaliação do perfil de textura dos tofus. À Dra. Marlice Bonacina, pelos ensinamentos, pelo exemplo de dedicação e pelas conversas motivadoras.

À Dra. Ilizandra Aparecida Fernandes pelas conversas, pelo auxílio com materiais e análises.

A todos os docentes do programa de pós graduação em engenharia de alimentos da Uri Erechim.

Às minhas eternas professoras, Dra. Fernanda, Dra. Danni e Dra. Divanilde, vocês são muito importantes para mim e sempre serei grata pelas oportunidades que vocês me proporcionaram ao longo da minha vida acadêmica.

À minha amiga Ivete Hermann, pela aquisição e envio de insumos de Portugal, você fez a diferença nos cuidados e atenção com minha encomenda.

À minhas amigas Daiane, Josiane e Karine, que além da companhia trouxeram alegria e descontração aos longos dias.

Aos bolsistas, Mateus e Natália, meu eterno agradecimento por toda a disposição e dedicação na realização das análises.

Às minhas amigas do grupo “Junção das gurias”: Djone, Giani, Jordana, Luana, Maiara, Maria, Roberta e Taciana, pela descontração, pelas conversas produtivas e outras nem

sempre tão produtivas. Vocês são especiais e tem o poder de curar a alma! Fazer parte deste grupo é uma das maiores alegrias que sinto. Deus foi muito generoso em possibilitar que nossos caminhos se cruzassem e mesmo com todas as diferenças que temos, aceitamos o jeito de ser de cada uma e assim formamos um grupo maravilhoso. Simplesmente amo todas.

Aos funcionários da Uri Erechim por todo bom atendimento e atenção, em especial a Vera, que por tantas vezes tirou, colocou e armazenou amostras em difentes equipamentos, para diferentes análises, obrigada por todo cuidado, por todo carinho e dedicação.

À família de Ademar e Marlene Bonato por toda atenção e cuidados nos cinco anos que fui sua inquilina. Obrigada pelas comidas, pelas boas conversas e por oportunizar conhecer novos lugares.

À CAPES pela concessão da bolsa.

À Uri Erechim por todo aporte para realização da pesquisa que possibilitou este trabalho.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

“Só eu conheço os planos que tenho para vocês: prosperidade e não desgraça e um futuro cheio de esperança”.  
(Jeremias 29:11)

“Só é verdadeiramente digno da liberdade, bem como da vida, aquele que se empenha em conquistá-la”.  
(Johann Goethe)

## Resumo

A soja apresenta considerável teor de proteínas, vitaminas, antioxidantes e minerais, sendo considerada um alimento de alto valor nutritivo e fonte de energia. O tofu é um dos produtos à base de soja, obtido a partir de coagulantes que podem ser químicos ou naturais. A flor do cardo é um coagulante de leites, sendo que uma das espécies mais utilizadas é o derivado da *Cynara cardunculus* L. A aplicação deste coagulante permite a obtenção de um queijo amanteigado e macio com características sensoriais diferenciadas devido a sua maior capacidade proteolítica. O objetivo deste trabalho foi otimizar o processo de obtenção do extrato hidrossolúvel de soja (EHS) a partir das cultivares de soja BRS 267 e Vmax, em função do teor de proteínas, e elaborar queijos tipo tofu, utilizando coagulante natural (flor do cardo) e químico (cloreto de magnésio-MgCl<sub>2</sub>) (padrão). Para a extração do EHS e definição das melhores características quanto às proteínas, foram realizados ensaios a partir de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup>, variando a temperatura de 30,90 °C a 59,10 °C e tempo de 0,36 a 11,64 h. A máxima extração de proteínas, 3,40 e 3,05 %, para BRS e Vmax, respectivamente, foi obtida a temperatura de 45 °C e tempo de 6 h de maceração. A partir do EHS foram desenvolvidas quatro formulações de tofus: F1 - cultivar BRS 267 e coagulante flor do cardo; F2 - cultivar Vmax e coagulante flor do cardo; F3 - cultivar BRS 267 e coagulante MgCl<sub>2</sub>; e F4- cultivar Vmax e coagulante MgCl<sub>2</sub>. Na avaliação sensorial, quanto a aceitabilidade os tofus apresentaram em média 5,28 = “Não gostei/nem desgostei”, porém os tofus desenvolvidos com flor do cardo apresentaram valores superiores, 5,52 e 6,00 para F1 e F2, respectivamente. Assim, estes resultados demonstram que os tofus coagulados com flor do cardo são promissores em relação aos tofus obtidos com coagulante MgCl<sub>2</sub>. Os resultados para intensão de compra mostraram intenção positiva, sendo que provavelmente comprariam, especialmente para amostra de tofu F2. Outro parâmetro avaliado foi a análise do perfil de textura (APT) dos tofus, em diferentes tempos de armazenamento (1°, 7°, 14° dias), mostrando considerável variabilidade entre as amostras, sendo que a dureza e a gomosidade aumentaram com o passar dos dias de armazenamento e a elasticidade e a coesividade diminuíram. Quanto aos padrões microbiológicos, os tofus apresentaram resultados satisfatórios até o 14° dia de armazenamento, para a contagem de coliformes a 45 °C (NMP/g), *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g) e *B. cereus*/g não apresentaram contagem, *Salmonella* sp. apresentou ausência, o que atende a legislação vigente, para todos os parâmetros avaliados. De acordo com a correlação de Pearson, houve discriminação entre as formulações de tofu, principalmente F3 e F4 (coagulante padrão MgCl<sub>2</sub>), em relação as formulações F1 e F2 coaguladas com flor do cardo. Portanto, é possível se produzir tofu com boas características tecnológicas, utilizando a flor do cardo, a qual é um coagulante natural, além do uso da variedade de soja BRS 267 que foi desenvolvida para consumo humano, com maiores teores de proteína, que se mantém em níveis maiores nos produtos (EHS e tofu). Este produto novo desenvolvido com coagulante vegetal pode ser mais uma alternativa de produto para os consumidores veganos, já que o consumidor tem disponível somente tofu com cloreto de magnésio, também para intolerantes a lactose e indivíduos que buscam manter-se saudáveis.

**Palavras-chave:** leguminosa, queijo vegano, coagulante natural, proteínas, nutricional, sensorial.

## Abstract

Soy has a considerable content of proteins, vitamins, antioxidants and minerals, being considered a food of high nutritional value and source of energy. Tofu is one of the soy-based products, obtained from coagulants that can be chemical or natural. The thistle flower is a milk coagulant, and one of the most used species is that derived from *Cynara cardunculus* L. The application of this coagulant allows to obtain a buttery and soft cheese with differentiated sensory characteristics due to its greater proteolytic capacity. The objective of this work was to optimize the process of obtaining the water-soluble soy extract (EHS) from the soybean cultivars BRS 267 and Vmax, depending on the protein content, and to make tofu-type cheeses, using natural coagulant (thistle flower) and chemical (magnesium chloride-MgCl<sub>2</sub>) (standard). For the extraction of EHS and definition of the best characteristics regarding proteins, assays were carried out from a Central Rotational Composite Design (DCCR) 22, varying the temperature from 30,90 °C to 59,10 °C and time from 0,36 to 11,64 h. The maximum extraction of proteins, 3,40 and 3,05 %, for BRS and Vmax, respectively, was obtained at a temperature of 45 °C and a time of 6 h of maceration. From the EHS, four tofus formulations were developed: F1 - cultivar BRS 267 and thistle flower coagulant; F2 - cultivar Vmax and thistle flower coagulant; F3 - cultivar BRS 267 and coagulant MgCl<sub>2</sub>; and F4- cultivate Vmax and MgCl<sub>2</sub> coagulant. In the sensory evaluation, as for acceptability, the tofus presented an average of 5.28 = "I did not like / dislike it", but the tofus developed with thistle flower presented higher values, 5.52 and 6.00 for F1 and F2, respectively. Thus, these results demonstrate that thofus coagulated with thistle flower are promising in relation to tofus obtained with coagulant MgCl<sub>2</sub>. The results for purchase intent showed positive intention, and they would probably buy, especially for the sample of F2 tofu. Another parameter evaluated was the analysis of the texture profile (APT) of the tofus, in different storage times (1st, 7th, 14th days), showing considerable variability between the samples, with the hardness and guminess increasing over the days storage and elasticity and cohesiveness decreased. As for microbiological patterns, the tofus showed satisfactory results until the 14th day of storage, for coliform count at 45 °C (NMP / g), positive coagulase *Staphylococcus* (UFC / g) and *B. cereus* / g did not count, *Salmonella* sp. showed absence, which complies with current legislation, for all evaluated parameters. According to Pearson's correlation, there was discrimination between the tofu formulations, mainly F3 and F4 (standard coagulant MgCl<sub>2</sub>), in relation to the F1 and F2 formulations coagulated with thistle flower. Therefore, it is possible to produce tofu with good technological characteristics, using the thistle flower, which is a natural coagulant, in addition to the use of the BRS 267 soybean variety that was developed for human consumption, with higher levels of protein, which remains at higher levels in products (EHS and tofu). This new product developed with a vegetable coagulant can be another product alternative for vegan consumers, since the consumer only has tofu with magnesium chloride available, also for lactose intolerants and individuals looking to stay healthy.

**Keywords:** legume, vegan cheese, natural coagulant, protein, nutritional, sensory.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Etapas para obtenção de Tofu.....	30
Figura 2: Imagem da flor do cardo ( <i>C. cardunculus</i> L.) .....	34
<b>Figura 1:</b> Curvas de contorno do teor de proteína em função do tempo (h) e da temperatura (°C) do processo de obtenção do EHS das cultivares BRS 267 (a) e Vmax (b). .....	68
<b>Figura 2:</b> SDS-PAGE de proteínas solúveis presentes em sobrenadantes obtidos a partir de: A - Marcadores de massa molecular, B - EHS da Vmax, C - EHS da BRS 267.....	69
Figura 1: SDS-PAGE de proteínas solúveis presentes em sobrenadantes obtidos a partir de dispersões de amostras de extrato de flor do cardo (a) e dos tofus desenvolvidos com cultivares de soja BRS 267 e Vmax e coagulantes flor do cardo e MgCl <sub>2</sub> (b). .....	95
Figura 2: Aspecto visual dos tofus desenvolvidos, F1 (a) – Tofu, Flor do cardo, BRS 267; F2 (b) – Tofu, Flor do cardo, Vmax; F3 (c) – Tofu, Cloreto de magnésio, BRS 267; F4 (d) – Tofu, Cloreto de magnésio, Vmax.....	97
Figura 3: Micrografias eletrônicas das formulações de tofu coagulados com flor do cardo no início do processo de coagulação F1 (a) e F2 (b) e após coagulação completa F1 (c) e F2 (d). .....	98
Figura 4: Micrografias eletrônicas das formulações de tofu coagulados com cloreto de magnésio no início do processo de coagulação F3 (a) e F4 (b) e após coagulação completa F3 (c) e F4 (d). .....	99
Figura 5: Histograma de Intensão de compra (%) dos tofus das formulações de tofu, F1 – Tofu, Flor do cardo, BRS 267; F2 – Tofu, Flor do cardo, Vmax; F3 – Tofu, Cloreto de magnésio, BRS 267; F4 - Tofu, Cloreto de magnésio, Vmax. ....	104
Figura 6: Atividade antioxidante expressa em valores de IC <sub>50</sub> para o extrato de flor do cardo, do EHS da Vmax e da BRS 267, e das formulações de tofus F1 e F2.....	105
Figura 7: Análise dos Componentes Principais (ACP) das formulações de Tofu (F1 – Tofu, Flor do cardo, BRS 267; F2 – Tofu, Flor do cardo, Vmax; F3 – Tofu, Cloreto de magnésio, BRS 267; F4 – Tofu, Cloreto de magnésio, Vmax) no 1º, 7º e 14º dia de armazenamento.....	107
Apêndice 6.1: Termo de consentimento livre e esclarecido.....	120
Apêndice 6.2: Ficha de avaliação sensorial dos tofus. ....	121
Apêndice 6.3: Figura com o perfil dos avaliadores da análise sensorial, frequência de consumo de tofu, escolaridade, idade, gênero e consume de tofu. ....	122
Apêndice 6.4: Figura do Histograma de Índice de aceitação global (%) dos tofus. F1 – Tofu, Flor do cardo, BRS 267; F2 – Tofu, Flor do cardo, Vmax; F3 – Tofu, Cloreto de magnésio, BRS 267; F4 - Tofu, Cloreto de magnésio, Vmax. ....	123

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Diferentes coagulantes utilizados para desenvolvimento de tofu.....	33
Tabela 2. Aplicação de flor do cardo como coagulante de leite.....	35
<b>Tabela 1:</b> Caracterização dos grãos <i>in natura</i> e do Extrato Hidrossolúvel de Soja –EHS das cultivares de soja BRS 267 e Vmax.....	62
<b>Tabela 2:</b> Teor de proteína do EHS das cultivares de soja BRS 267 e Vmax em função do tempo e temperatura no processo de obtenção do EHS. ....	67
Tabela 1: Características físicas e químicas das formulações de tofus elaborados com as cultivares BRS 267 e Vmax coagulados com flor do cardo e cloreto de magnésio durante os dias de armazenamento (1, 7 e 14 dias).....	89
Tabela 2: Perfil de textura (dureza, gomosidade, elasticidade coesividade) de tofus desenvolvidos com as cultivares de soja BRS 267 e Vmax (F1, F2, F3 e F4) no 1, 7 e 14º dias de armazenamento. ....	100
Tabela 3: Resultados das análises microbiológicas realizadas nas quatro formulações de tofu. ....	102
Tabela 4: Valores médios do teste de aceitação e intenção de compra para as diferentes formulações de tofu. ....	104
Tabela 5: Matriz de correlação (r) de Pearson para as variáveis umidade, pH, cinzas, lipídeos, cor L*, a*, b*, C*, °Hue, Inibidor de tripsina Kunitz, atividade ureática, ácido fítico, acidez, rendimento, sinérese, aceitação, perfil textura (dureza, gomosidade, elasticidade, coesividade) de formulações de Tofu (F1 -, F2 - F3 - e F4 -) no 1º, 7 e 14º dia de armazenamento. ....	108

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 SOJA.....	20
<b>3.1.1 Composição do grão da soja.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.1.1 Proteínas.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.1.1.1 Solubilidade proteica.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.1.2 Inibidor de Tripsina Kunitz.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.1.3 Ácido fítico.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.1.4 Atividade ureática.....</b>	<b>26</b>
3.2 EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA (EHS).....	27
3.3 TOFU.....	29
3.3.1 COAGULANTES.....	32
<b>3.3.1.1 Flor do cardo.....</b>	<b>34</b>
<b>3.3.1.2 Cloreto de magnésio.....</b>	<b>36</b>
3.4 CARACTERÍSTICAS DE TEXTURA E SENSORIAIS.....	37
<b>3.4.1 Perfil de textura.....</b>	<b>37</b>
<b>3.4.2 Caracterização sensorial de aceitabilidade e intensão de compra.....</b>	<b>38</b>
3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
3.6 REFERÊNCIAS.....	39
CAPÍTULO 1.....	52
ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO TEMPO E DA TEMPERATURA NA OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA DAS CULTIVARES BRS 267 E VMAX. ....	52
1 INTRODUÇÃO.....	53
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
2.1 SOJA.....	54
2.2 EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA (EHS).....	54
2.3 INFLUÊNCIA DO TEMPO E DA TEMPERATURA NA ETAPA DE MACERAÇÃO NA OBTENÇÃO DO EHS.....	55
2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS DOS GRÃOS E DO EHS.....	55
<b>2.4.1 Umidade.....</b>	<b>55</b>
<b>2.4.2 pH.....</b>	<b>56</b>
<b>2.4.3 Resíduo mineral (cinzas).....</b>	<b>56</b>
<b>2.4.4 Lipídios.....</b>	<b>56</b>
<b>2.4.5 Proteínas.....</b>	<b>56</b>
<b>2.4.6 Cor.....</b>	<b>56</b>
<b>2.4.7 Índice de Solubilidade do Nitrogênio.....</b>	<b>57</b>
<b>2.4.8 Índice de Dispersibilidade Proteica.....</b>	<b>57</b>
<b>2.4.9 Inibidor de tripsina Kunitz.....</b>	<b>57</b>

2.4.10 Atividade ureática .....	58
2.4.11 Ácido fítico .....	59
2.4.12 Componentes minerais .....	59
2.4.13 Sólidos solúveis.....	60
2.4.14 Acidez titulável.....	60
2.4.15 Frações proteicas da massa molecular por eletroforese (SDS-PAGE) .....	60
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	60
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60
3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRÃOS DE SOJA <i>IN NATURA</i> E DO EHS .....	60
3.2 INFLUÊNCIA DO TEMPO E DA TEMPERATURA NO PROCESSO DE OBTENÇÃO DO EHS .....	67
3.3 FRAÇÕES PROTEICAS NOS EHS .....	69
4 CONCLUSÃO .....	70
AGRADECIMENTOS .....	70
REFERÊNCIAS .....	70

CAPÍTULO 2 .....	76
ELABORAÇÃO E CARATERIZAÇÃO DE TOFUS COM EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DAS CULTIVARES DE SOJA BRS 267 E VMAX UTILIZANDO FLOR DO CARDO ( <i>CYNARA CARDUNCULUS L.</i> ) COMO COAGULANTE.....	76
2.1 INTRODUÇÃO .....	77
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	79
2.2.1 Soja.....	79
2.2.2 Obtenção do Extrato Hidrossolúvel de Soja (EHS).....	79
2.2.3 Obtenção do extrato coagulante de flor do cardo.....	79
2.2.4 Elaboração de formulações de tofu.....	80
2.2.5 Determinação de rendimento e sinérese .....	80
2.2.6 Análise microbiológica .....	81
2.2.9 Análise Sensorial.....	83
2.2.10 Determinações analíticas.....	83
2.2.10.1 Atividade proteolítica .....	83
2.2.10.2 Umidade.....	84
2.2.10.3 Determinação de pH.....	84
2.2.10.4 Resíduo mineral (Cinzas) .....	84
2.2.10.5 Lipídios .....	84
2.2.10.6 Proteína .....	84
2.2.10.7 Índices de cor $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ , $\Delta E$ , $^{\circ}\text{Hue}$ e $^{\circ}\text{C}$ .....	84
2.2.10.8 Inibidor de tripsina Kunitz.....	85
2.2.10.9 Determinação da atividade ureática .....	86
2.2.10.10 Quantificação do ácido fítico .....	86
2.2.10.11 Acidez titulável.....	87
2.2.10.12 Frações proteicas por eletroforese (SDS-PAGE) .....	87
2.2.10.13 Atividade antioxidante por DPPH .....	87
2.2.10.14 Análise do Perfil de Textura (APT) .....	88

<b>2.2.10.15 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b> .....	<b>88</b>
<b>2.2.11 Análise estatística</b> .....	<b>88</b>
<b>2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>88</b>
<b>2.3.1 Características físicas e químicas dos tofus</b> .....	<b>88</b>
<b>2.3.2 Frações proteicas</b> .....	<b>95</b>
<b>2.3.3 Características visuais, morfológicas e de textura dos tofus</b> .....	<b>96</b>
<b>2.3.4 Avaliação microbiológica dos tofus</b> .....	<b>101</b>
<b>2.3.5 Análise sensorial dos tofus</b> .....	<b>102</b>
<b>2.3.6 Atividade Antioxidante</b> .....	<b>104</b>
<b>2.3.7 Análise multivariada: Componentes principais (ACP) e correlação de Pearson</b> .....	<b>106</b>
<b>2.4 CONCLUSÃO</b> .....	<b>109</b>
<b>2.5 AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>109</b>
<b>2.6 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>109</b>
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	<b>118</b>
<b>5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>119</b>
<b>6 APÊNDICES DO PRESENTE ESTUDO</b> .....	<b>120</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas  
ACP – Análise de Componentes Principais  
A. fítico – Ácido fítico  
APT – Análise de Perfil de Textura  
A. ureática – Atividade ureática  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AOAC – Association of Official Analytical Chemists  
APROSOJA – Associação dos produtores de soja e milho de estado de Mato Grosso  
CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética  
CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio  
CNNPA – Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos  
CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento  
DOP – Denominação de origem Protegida  
ECB – Extrato coagulante de flor do cardo e cultivar BRS 267  
ECV – Extrato Coagulante de flor do cardo e cultivar Vmax  
EHS – Extrato Hidrossolúvel de Soja  
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
FAAS – Espectrometria de absorção atômica com chama (*Flame Atomic Absorption Spectrometry*)  
FDA - Food and Drug Administration  
F1 – Tofu, desenvolvido com a cultivar BRS 267 e coagulado com flor do cardo  
F2 – Tofu, desenvolvido com a cultivar Vmax e coagulado com flor do cardo  
F3 – Tofu, desenvolvido com a cultivar BRS 267 e coagulado com MgCl<sub>2</sub>  
F4 – Tofu, desenvolvido com a cultivar Vmax e coagulado com MgCl<sub>2</sub>  
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IDP – Índice de Dispersibilidade Proteica  
ISN – Índices de Solubilidade do Nitrogênio  
ITK – Inibidor de Tripsina Kunitz  
MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio  
NMP/g – Número mais provável por grama  
TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos  
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
UFC/g – Unidade formadora de colônia por grama.  
MEV – Microestrutura eletrônica de varredura

## 1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das mais importantes *commodities* brasileiras. É a base de rações para diversos animais e de muitos produtos alimentícios para humanos, pois sua aplicação versátil garante o destaque econômico nacional e internacional.

No Brasil, a produção aumenta a cada safra, não só pelo aumento da área de plantio, mas também pela aplicação de novas tecnologias de cultivo. Neste sentido, a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) representa uma importante fonte de pesquisa de desenvolvimento de tecnologia para a agricultura e, em especial para soja, pois possibilita a obtenção de cultivares modificadas que apresentam resistência a doenças e pragas e com características específicas para o consumo humano.

A composição nutricional da soja, com alto teor de proteínas, é o que garante a ela o papel de destaque entre os demais vegetais, pois pode ser utilizada como substituto a alimentos de origem animal. Porém, essa oleaginosa apresenta sabor característico, sendo considerado um pouco desagradável para alguns consumidores. As enzimas lipoxigenases, presentes naturalmente na soja, são responsáveis pelo sabor adstringente nos grãos e em seus derivados. Todavia, pode-se minimizar este sabor utilizando cultivares desenvolvidas para consumo humano, que apresentam ausência deste componente, ou utilizar tecnologias de processamento que inativam essas enzimas.

O consumo da soja, por humanos, também está ligado aos benefícios à saúde, proporcionando a diminuição dos efeitos da menopausa nas mulheres, a prevenção de problemas cardiovasculares, melhora nos índices glicêmicos e retardamento do envelhecimento precoce. Portanto, o desenvolvimento de diferentes produtos contendo soja com boa qualidade pode proporcionar aumento da aceitação e da demanda dos grãos desta cultura.

O tofu é um dos produtos à base de soja que apresenta possibilidade de melhoramento tecnológico de suas características sensoriais, para que tenha melhor aceitação pelos consumidores. O tofu é um alimento proteico originário da China, que apresenta sabor suave e textura porosa, considerado saudável, pois é livre de colesterol e pode substituir produtos de origem animal. Assim, o tofu apresenta-se como importante fonte de proteínas para os indivíduos veganos, para intolerantes a lactose e para a população de modo geral que busca alimentos mais saudáveis.

O desenvolvimento do tofu passa por várias etapas, iniciando com a lavagem dos grãos de soja, seguida de maceração e moagem, filtração do extrato hidrossolúvel (EHS) e adição dos coagulantes após o aquecimento. Os coagulantes podem ser de diferentes fontes, natural, química e microbiológica. O tipo de coagulante é um dos fatores que influencia nas diferentes características do tofu, porém, a qualidade do mesmo pode ser influenciada por diversos outros fatores como: o tipo de processamento, tempo e temperatura de maceração, propriedades das sementes de soja, tipo e concentração de coagulante, além de outros fatores.

Na busca por cultivares de soja com características mais palatáveis, visando atender a demanda do mercado consumidor por produtos à base de soja, com sabor mais

agradável e com alto valor nutritivo, foi desenvolvida pela Embrapa a cultivar de soja BRS 267 possui grãos graúdos e presença de lipoxigenases (LOX), se apresenta como matéria-prima adequada para consumo como hortaliça (Edamame) ou para processamento de tofu (CARRÃO-PANIZZI et al., 2009). Essa cultivar apresenta elevado teor protéico, maior teor do ácido oléico, teor de agliconas, de açúcares, dos aminoácidos ácido glutâmico e alanina, características que podem resultar em sabor mais agradável em alimentos de soja, melhorando também o seu valor nutricional (Silva, 2009). Proporcionando, neste estudo, realizar a comparação com a Vmax, cultivar convencional também produzida pela Embrapa, que apresenta em sua composição as enzimas lipoxigenases (LOX). Em estudo de Rigo et al. (2015) a farinha da cultivar Vmax sem branqueamento e sem casca apresentou valor de 29,5 g/100g e essa característica do teor de óleo serve como indicativo para o uso tecnológico, pois o elevado teor a cultivar Vmax pode ser usada para aumentar o conteúdo lipídico no processamento de alimentos ou nas indústrias de extração de óleo.

Visando atender o consumo de produtos nutritivos, por indivíduos veganos, pode-se utilizar coagulantes de origem vegetal como opção de coagulação do tofu, como kiwi, limão, gengibre, maçã, abacaxi, entre outros. Outro coagulante vegetal que pode ser utilizado é a flor do cardo, que apresenta um bom potencial de coagulação de leites e é uma das espécies mais utilizadas, sendo o mesmo derivada da *Cynara cardunculus*, porém ainda não testado para coagulação de EHS, de acordo com a literatura. O etato destaca-se que quando este coagulante é aplicado em leite de ovelha, proporciona o desenvolvimento de queijos amanteigados, com características sensoriais únicas.

Neste sentido, a principal inovação deste trabalho é o uso da flor do cardo como coagulante na obtenção de tofu a partir do extrato hidrossolúvel das cultivares de soja Vmax (convencional) e BRS 267 (convencional e especial para alimentação humana), e avaliação das características físico-químicas, reológicas, microbiológicas e sensoriais, em comparação ao tofu coagulado com o coagulante químico tradicional, ou seja, o cloreto de magnésio.

A estrutura da tese está apresentada de acordo com os temas estudados, sendo que os resultados obtidos estão divididos em dois capítulos (capítulo 1 e 2).

- 1: Introdução do trabalho, apontando as justificativas do estudo.
  - 2: Objetivos, geral e específicos.
  - 3: Revisão da literatura referente a soja, composição, extrato hidrossolúvel, tofu, tipos de coagulante, textura e análise sensorial.
- Capítulo 1: Estudo da influência do tempo e da temperatura na obtenção de extrato hidrossolúvel de soja das cultivares BRS 267 e Vmax.
- Capítulo 2: Avaliação sensorial e caracterização físico-química de tofu desenvolvido a partir das cultivares de soja BRS 267 e Vmax utilizando diferentes coagulantes.
- 4: Conclusões.
  - 5: Sugestões de trabalhos futuros.
  - 6: Apêndices.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver o queijo tipo tofu a partir do extrato hidrossolúvel de soja das cultivares BRS 267 e Vmax utilizando flor do cardo e cloreto de magnésio como coagulantes.

### 2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a influência do tempo e da temperatura no processo de obtenção do extrato hidrossolúvel (EHS) com maior conteúdo proteico, empregando metodologia Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR);
- Caracterizar as cultivares de soja e os EHS quanto a: umidade, pH, cinzas, lipídios, proteína bruta, cor, índice de solubilidade proteica (ISN), índice de dispersibilidade proteica (IDP), inibidor de tripsina Kunitz (ITK), atividade ureática, ácido fítico, composição mineral (Ca, Mg, K, Zn, Cu, Fe e Mn);
- Caracterizar o EHS quanto ao teor de sólidos solúveis, acidez e rendimento;
- Elaboração de formulações de tofu com coagulantes flor do cardo e cloreto magnésio e caracterizá-los quanto às características físicas e químicas: umidade, pH, cinzas, lipídios, proteína bruta, cor, inibidor de tripsina Kunitz (ITK), atividade ureática, ácido fítico, sólidos solúveis, acidez;
- Determinar as frações proteicas através de eletroforese (SDS-PAGE) dos EHS, da flor do cardo e dos tofus;
- Avaliar a qualidade microbiológica (contagem de coliformes a 45 °C (NMP/g), *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g), *B. cereus*/g, *Salmonella* sp.) dos tofus no 1º, 7º e 14º dia de armazenamento;
- Realizar a análise do perfil de textura (APT) dos tofus armazenados 1º, 7º e 14º dia;
- Caracterizar os tofus quanto a estrutura através de análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Analisar os EHS, tofus e a flor do cardo quanto a atividade antioxidante;
- Caracterizar os tofus quanto ao rendimento e sinérese;
- Avaliar a vida útil dos tofus no 1º, 7º e 14º dia de armazenamento, quanto as características físico-químicas: umidade, pH, cinzas, lipídios, proteína bruta, cor, inibidor de tripsina Kunitz (ITK), atividade ureática, ácido fítico, acidez.
- Avaliar sensorialmente os tofus quanto à aceitabilidade e intenção de compra.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item é apresentada uma breve revisão da literatura sobre a soja, sua composição e características nutricionais, além do extrato hidrossolúvel da soja, tofus, coagulantes, perfil de textura e análise sensorial.

#### 3.1 SOJA

A soja é uma semente oleaginosa pertencente à família Leguminosae e subfamília Fabaceae e ao gênero [*Glycine max* (L.) Merrill] (MANDARINO, 2008). É uma cultura cuja origem se atribui ao continente asiático, da região do rio Yangtse, na China e que difere muito da soja que se conhece hoje, pois as plantas eram rasteiras e foram sendo domesticadas a partir de cruzamentos naturais realizados por cientistas chineses. A primeira referência como alimento data de mais de 5.000 anos atrás, citado e descrito pelo imperador chinês Shen-nung, “pai” da agricultura chinesa (APROSOJA, 2018). Considerada na China Antiga um dos cinco grãos sagrados, juntamente com arroz, trigo, cevada e painço, a soja é uma das culturas com maior rendimento e desempenha papel muito importante na nutrição de humanos e animais. As formas de cultivo de soja e de preparação de alimentos com os grãos da mesma foram sendo introduzidos gradativamente no Japão, Coreia e outros países vizinhos há cerca de 1100 anos (LIU, 2016).

Os chineses pouco a pouco desenvolveram grande variedade de alimentos nutritivos a partir da soja, incluindo leite de soja, tofu, brotos de soja, pasta de soja fermentada e molho de soja. Os habitantes do Japão e Indonésia não apenas aceitaram o modo chinês de preparar alimentos a base de soja, mas também desenvolveram novos alimentos com esta espécie. *Nattō* japonês e o *tempeh* indonésio são dois bons exemplos. Todos esses alimentos são agora conhecidos como alimentos tradicionais de soja (LIU, 2016).

Com o passar dos tempos a soja foi introduzida nos demais continentes, porém as primeiras experiências de produção na Europa falharam, provavelmente, devido a influência climática, carência de informação sobre a cultura e suas necessidades (EMBRAPA, 2004).

O cultivo comercial da soja iniciou nos Estados Unidos, nos primeiros anos do século XX, e na segunda década do mesmo século, quando o teor de óleo e proteína do grão passou a chamar a atenção, ocorrendo a expansão da industrialização (APROSOJA, 2018).

Os primeiros registros históricos para cultivos experimentais de soja no Brasil datam de 1882, na Bahia, entretanto, considera-se a introdução da soja no País no ano de 1901 quando iniciou seu cultivo na Estação Agropecuária de Campinas e posterior distribuição de sementes para produtores de São Paulo. Em 1914, foi oficialmente introduzida no Rio Grande do Sul, que tem o primeiro registro de cultivo de soja do Brasil no município de Santa Rosa, o qual é considerado o “berço nacional da soja”, sendo que a mesma, neste período, era usada principalmente como fonte de alimento de suínos (APROSOJA, 2018).

A soja é a cultura agrícola que mais cresceu nas últimas três décadas, respondendo pela metade da área nacional cultivada com grãos. A produção da oleaginosa, quanto ao agronegócio mundial, está fortemente consolidada como uma atividade econômica das mais expressivas e crescentes, sendo que o Brasil possui expressiva participação na oferta e na demanda de produtos do complexo agroindustrial da soja (CAMPEÃO et al. 2020).

A expansão da cultura de soja no Brasil começou nos anos de 1970, estabelecendo-se como principal produto do agronegócio nacional, com ampliação da indústria de óleo, mediada pelo desenvolvimento de tecnologias e pesquisas e, principalmente, pela demanda internacional do grão. Inicialmente, a região sul foi a produtora majoritária, porém, atualmente, a região do cerrado estabeleceu-se como maior produtora do país, com o estado do Mato Grosso ocupando a posição de maior produtor nacional (APROSOJA, 2018).

Na safra de 2019/2020, segundo o levantamento da CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), a produção de soja foi de 120,9 milhões de toneladas do grão, com aumento de 5,1 % comparado com a safra anterior (CONAB, 2020).

A Embrapa é um dos mais importantes agentes do dinamismo e evolução da sojicultura brasileira, pois tem desenvolvido novas cultivares com excelente potencial de produtividade e adaptadas às condições edafoclimáticas das regiões brasileiras (CARRÃO-PANIZZI et al., 2012; APROSOJA, 2018). Esta busca desenvolver cultivares com alta produtividade, além de características especiais para utilização na alimentação humana, tais como diminuição do sabor característico da soja e fatores antinutricionais (Inibidor de Tripsina Kunitz), ausência de lipoxigenases, variação do tamanho da semente, aumento do teor de proteínas e melhor valor nutricional (BRUNE et al., 2010).

Devido ao alto teor de proteína e aos aminoácidos essenciais relativamente bem equilibrados: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina e triptofano. Apresenta quantidade satisfatórias para suprir as necessidades do ser humano, a soja é uma cultura versátil, altamente adaptável, servindo de base alimentar em várias cadeias produtivas (DOS SANTOS et al., 2005). O farelo de soja, principal produto derivado, é fonte de proteínas na composição de rações para avicultura, suínocultura, bovinocultura e aquíicultura (SEO e CHO, 2016). A soja ainda é utilizada em todo o mundo como uma fonte de proteína para consumo humano, pois possui proteína de alta qualidade, além de outros benefícios nutricionais, como por exemplo auxiliar na redução do colesterol sanguíneo (WANG et al., 2014; TASSI et al., 2019).

Por ser rica em compostos biologicamente ativos como as isoflavonas, que agem na prevenção e preservação da saúde humana (CARRÃO-PANIZZI, 2001; FANG et al., 2012), a soja pode ser utilizada como ingrediente em diferentes formulações de produtos alimentícios podendo melhorar e aumentar a fortificação nutricional da dieta (AZEVEDO, 2011).

A soja apresenta-se como alimento com grande potencial para desempenhar um papel importante em resposta à insegurança alimentar global que resulta da crescente demografia da população. A população mundial está estimada para crescer acima de 10 bilhões até 2100 (GERLAND et al., 2014), e grande parcela deste aumento acontece na

África (CLELAND, 2013), onde a falta de alimentos é uma ameaça. Com altos índices de proteína (40 %), o grão de soja, que apresenta todos os aminoácidos em quantidades suficientes para a saúde humana e alto teor de óleo (20 %), pode auxiliar na alimentação humana. Para tanto, pesquisas são realizadas para a obtenção de variedades com características especiais para diferentes usos, englobando a alimentação humana, ração animal e biocombustíveis (CHIBEBA et al., 2018).

Para o desenvolvimento de cultivares de soja para a alimentação humana, além do rendimento elevado, também são consideradas as seguintes características: melhor sabor, aspecto físico dos grãos, aumento do teor de proteína, isoflavonas e carboidratos, redução de lipídios e fatores antinutricionais (CARRÃO-PANIZZI e SILVA, 2013).

A soja apresenta grande versatilidade na indústria de alimentos e devido ao seu alto teor de proteínas tem sido alvo de inúmeras pesquisas quanto aos seus aspectos tecnológicos e no desenvolvimento de novos produtos. Quando adequadamente processada, a soja apresenta-se como uma excelente fonte proteica, apesar da pouca aceitabilidade dos seus derivados. Porém, por ser um alimento de origem vegetal tem suas limitações quanto aos aminoácidos sulfurados (metionina e cistina), o que tem estimulado a combinação com fontes alimentares de origem animal, visando aumentar a disponibilidade e a capacidade nutricional destes alimentos, melhorando também os aspectos sensoriais (WEINGARTNER, 1987, CARRÃO-PANIZZI e MANDARINO, 1998; CIABOTTI et al., 2009).

A soja pode ser utilizada na forma *in natura*, bem como, podem ser desenvolvidos diversos produtos derivados da leguminosa, dentre os quais estão o extrato hidrossolúvel de soja e o tofu, que são alimentos não fermentados (PAULETTO e FOGAÇA, 2012).

A cultivar de soja BRS 267 é convencional, com presença de lipoxigenase (LOX) e apresenta sementes grandes com 22 g por 100 sementes maduras, hilo claro e melhor sabor foi desenvolvida para o consumo humano pela Embrapa. Além do tamanho maior, sabe-se que os grãos da BRS 267 apresentam sabor superior, sendo adequada para a produção de “tofu” (queijo de soja) (CARRÃO-PANIZZI et al., 2009; SILVA et al., 2012, CARRÃO-PANIZZI et al., 2018). Já a cultivar de soja Vmax é convencional, produzida pela Embrapa, que apresenta em sua composição as enzimas lipoxigenases (LOX) (RIGO et al., 2015), apresenta hilo marrom claro e peso de 18 g por 100 sementes maduras. É importante salientar que a cor do hilo e o tamanho dos grãos da soja, são fundamentais para obtenção de leite e tofu, bem como tamanho dos grãos, sendo preferidos os maiores, como hilo de coloração clara.

### **3.1.1 Composição do grão da soja**

O grão de soja “*in natura*” é constituído por 8 % de casca, 90 % de cotilédones e 2 % de hipocótilo. A composição centesimal dos grãos de soja consiste basicamente de 20 % de óleo, 40 % de proteína, 35 % de carboidratos, 5 % de cinzas (FARIA et al., 2018). De acordo com Liu (2016), a composição pode ser de 19 % de óleo e 36 % de proteínas, 19 % de carboidratos insolúveis, 9 % de carboidratos solúveis, 13 % de umidade e 4 % de cinzas. O conteúdo expresso pelos grãos da soja, pode variar e depende da interação com o meio ambiente (BARBOSA et al., 2011). Segundo Faria et

al. (2018) após estudos relacionados a diferentes épocas de plantio e composição química do grão, os mesmos concluíram que os fatores ambientais podem contribuir fortemente para a concentração de óleo e proteína nos grãos.

Ao avaliar a composição química e o rendimento entre as partes estruturais da soja, estas são consideravelmente afetadas por uma série de fatores, tais como, a genética das cultivares, condições climáticas (luz, umidade, intensidade e precipitação), localização, safra de produção, época de plantio, regionalidade e também pelas condições de colheita e armazenamento. Os componentes da soja que podem ser afetados são as isoflavonas, proteínas, lipídios e lipoxigenases (CARRÃO-PANIZZI et al., 2009; FREIRIA et al., 2016). A soja possui o maior teor de proteína entre as espécies de cereais e outras leguminosas. O teor de proteína em outras leguminosas varia entre 20 e 30 %, enquanto em cereais varia entre 8 e 15 %. A soja também tem o segundo maior teor de óleo entre todas as leguminosas alimentares (depois do amendoim). Por isso, esta é considerada uma oleaginosa (LIU, 2016).

Considerando sua composição química, cerca de 60 % do peso seco do grão é formado pela soma entre as quantidades de óleo e proteína (20 g de óleo e 40 g de proteína), 30 g de glicídios (com a presença dos ácidos graxos linoléico e linolênico), 13 g de água e 5 g de minerais (CARRÃO-PANIZZI e MANDARINO, 1998), com 8,8 mg de ferro, 226 mg de cálcio, 546 mg de fósforo e consideráveis teores de vitaminas do complexo B, lecitinas (5 %) e saponinas (4 %), tocoferóis, inibidores de protease e isoflavonas, sendo estas de grande interesse por suas propriedades funcionais (AGUIAR, 2002; ZAKIR e FREITAS, 2015).

### **3.1.1.1 Proteínas**

As proteínas são essenciais para a criação, funcionamento e manutenção da vida, pois são elementos básicos de todas as células vivas e estão envolvidas praticamente em todas as funções fisiológicas. São indispensáveis na regeneração de tecidos; atuam como catalisadores nas reações químicas que ocorrem nos organismos vivos e que envolvem enzimas ou hormônios; são necessárias nas reações imunológicas e, junto com os ácidos nucleicos, são fundamentais nos fenômenos de crescimento e reprodução (TRINDADE, 2014). Por estas razões, proteínas alimentares completas, altamente digeríveis e de alta qualidade são valorizadas e demandadas. No entanto, a disponibilidade das proteínas depende de vários fatores, incluindo principalmente a fonte proteica, e a sua aceitação pelo consumidor (FAO, 2017).

As proteínas de soja são compostas por uma mistura de albuminas e globulinas, 90 % das quais são proteínas de armazenamento com estrutura globular. As proteínas de soja contêm 18 aminoácidos essenciais, incluindo aqueles que contêm grupos funcionais polares, tais como grupos carboxila, amina e hidroxila, que são capazes de reagir quimicamente e fazer com que a proteína de soja seja facilmente modificada (MATEOS-APARICIO et al., 2008; TIAN et al., 2018).

As características tanto de desnaturação e agregação térmica das proteínas são importantes formas de estrutura para a formação do isolado de proteína de soja (IPS), que apresentam papéis significativos na aplicação do IPS na indústria de alimentos. Atender as especificações para tipos diferentes de alimentos promove o controle da

agregação térmica do IPS durante o desenvolvimento de alimentos (ZUO et al., 2016; WANG et al., 2017).

#### **3.1.1.1.1 Solubilidade proteica**

A solubilidade de uma proteína é determinada como a porcentagem de proteína que se conserva em solução ou dispersão coloidal diante de condições específicas e que não apresenta sedimentação com forças centrífugas moderadas (ORDÓÑEZ et al., 2005). Possuir o conhecimento da solubilidade das proteínas é necessário para medir a funcionalidade proteica e os tipos de interações químicas ocorridas entre as mesmas. Esta solubilidade está diretamente relacionada com fatores intrínsecos (composição e sequência de aminoácidos) e extrínsecos (pH, força iônica, temperatura e concentração do solvente) (SATHE, 2012).

No caso da soja, a solubilidade das proteínas é uma característica importante, pois define a correta aplicação dos grãos no processamento de alimentos. As proteínas da soja apresentam sensibilidade as diferentes condições de desnaturação. A grande maioria dos alimentos processados passam por tratamentos térmicos durante o seu processamento, sendo a desnaturação pelo calor, especialmente o calor úmido, de importância particular, pois reduz a solubilidade das proteínas. Deste modo, os índices que quantificam a solubilidade das proteínas são de grande importância para avaliar o grau de tratamento térmico aplicado aos produtos proteicos de soja. Os mais comuns são o índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) e o índice de dispersibilidade de proteína (IDP) (CARRÃO-PANIZZI et al., 2006).

Assim, torna-se um dos critérios de qualidade mais utilizado na indústria, pois as propriedades funcionais, como formação de espuma, emulsificação e gelificação, são afetadas pela solubilidade da proteína (DAMODARAN et al., 2010). Os índices de solubilidade de nitrogênio (ISN) e os índices de dispersibilidade proteica (IDP) devem apresentar-se acima de 65 % o que irá demonstrar uma qualidade satisfatória da proteína da soja. Em estudo realizado por Oliveira et al. (2016) utilizando 450 amostras de soja coletadas em nove Estados produtores na safra 2014/2015, e caracterizando a matéria-prima soja em relação a esses atributos, verificaram que o IDP foi superior a 80 % em todas as amostras avaliadas. Em relação ao ISN, somente as amostras dos estados de Goiás e Bahia apresentaram valores inferiores a 70 %, os estados do Centro-oeste e Sudeste apresentaram valores intermediários e os estados do Sul obtiveram os maiores índices. Possivelmente o que causou as diferenças de resultados foram as condições climáticas, estocagem dos grãos ou até mesmo as propriedades das cultivares avaliadas.

Os índices de solubilidade proteica são geralmente mensurados por métodos de solubilidade do nitrogênio (ISN) ou, em inglês, *nitrogen solubility index* (NSI) e do índice de dispersibilidade de proteína (IDP) ou, em inglês, *protein dispersibility index* (PDI). O ISN apresenta os valores de nitrogênio solúvel em água com percentual do nitrogênio total e é usado em muitos casos como uma medida da dispersibilidade de proteína. Logo, o IDP é medido pela água de extração das proteínas, através da centrifugação e análise das proteínas do sobrenadante e é apresentada como percentagem de proteína dispersível em água dividida pelo percentual total de proteína. A diferença entre o ISN, simulando a fração percentual de componentes nitrogenados

solúveis em água sob condições específicas, e o IDP, encontra-se na velocidade de agitação descrita em cada método. Normalmente o IDP é verificado com agitação forte, em homogeneizadores, e o ISN, com agitação mais lenta. Os percentuais de IDP e ISN são utilizados pela indústria como uma medida de solubilidade de proteína depois do tratamento térmico da soja (OETTERER et al., 2006).

Como a condição da estrutura da proteína está diretamente ligada com a solubilidade proteica, ela é normalmente usada como medida da intensidade do tratamento térmico e do estado de desnaturação (JIDEANI, 2011). De maneira geral, a solubilidade da proteína é aumentada quando submetida a temperatura entre 40 e 50 °C. No entanto, em temperaturas mais altas, a proteína é desnaturada, acontecendo o aumento na energia cinética térmica, que causa o desdobramento da proteína (desnaturação), deixando em exposição os grupos não polares, que provocam a agregação e precipitação, ou seja, diminuição da solubilidade da proteína quando comparada com a estrutura nativa das proteínas e caracteriza-se por um estado termodinamicamente estável com pequena energia livre e estabilização entre interações atrativas e repulsivas (PELEGRINE e GASPARETTO, 2005; DAMODARAN, 2010).

### **3.1.1.2 Inibidor de Tripsina Kunitz**

A presença dos inibidores de protease ocorre naturalmente nas leguminosas, estes são metabólitos importantes de defesa das plantas contra insetos e patógenos, pela sua capacidade de inibir enzimas do trato digestivo de insetos. Outra importante função das proteases está associada a germinação de sementes, desenvolvimento vegetativo e morte celular programada (ROSSI et al., 2010).

Os inibidores de protease estão classificados em duas categorias fundamentais: inibidor de tripsina Kunitz (ITK) com alta massa molecular, com aproximadamente 20.000 kDa, que possuem duas pontes dissulfeto, 181 resíduos de aminoácidos e possuem especificidade primária para tripsina e o denominado de inibidor de Bowman-Birk (IBB) de massa molecular entre 6.000 e 10.000 kDa, com elevada quantidade de ligações dissulfeto, 71 resíduos de aminoácidos e capacidade para inibir tripsina e quimotripsina em sítios de ligação independentes (BRUNE et al., 2010). De acordo com Benevides et al. (2011) em torno de 80 % da inibição da atividade trípica de grãos de soja é ocasionada pela ação do ITK. Este fator antinutricional liga-se à enzima tripsina, que atua na digestão de proteínas, evitando assim a absorção dessas proteínas, provocando a redução no crescimento e desenvolvimento de humanos e de animais (OLIVEIRA et al., 2008).

Como a soja possui componentes bioativos, como os inibidores de protease, que têm sido associados às propriedades antinutricionais do consumo de soja, há necessidade de retirar ou inativar os inibidores de proteases, pois o valor nutritivo da soja é afetado de forma negativa pela presença dos mesmos, considerados como 32 fatores antinutricionais (MONTEIRO et al., 2004).

Para promover um aumento na qualidade nutricional da proteína de soja, é necessária a inativação térmica desses compostos (LIU, 2004). Os métodos mais eficazes para a inativação de fatores antinutricionais em farelos de cereais incluem calor seco e calor úmido (KAUR et al., 2012). A alta temperatura é necessária para inativar os

inibidores de tripsina, por isso é preciso considerar as condições de processamento de soja entre a solubilidade da proteína e inativação de proteínas anti-nutricionais (PREECE et al., 2017).

Segundo Rekha e Vijayalakshmi (2013) o emprego do calor aumenta a digestibilidade das proteínas da soja, com o aumento do tempo de ebulição, a digestibilidade do extrato hidrossolúvel de soja aumentou e atingiu um máximo de 97,3 % após 15 min. Estes resultados corroboram com a teoria de que o tratamento térmico adequado aumenta a digestibilidade das proteínas da soja devido à destruição de inibidores de tripsina lábeis ao calor e, possivelmente, outros componentes biologicamente ativos.

### **3.1.1.3 Ácido fítico**

A soja apresenta excelente valor nutritivo e possui compostos bioativos, como ácido fítico (AF) que é um componente presente naturalmente nos grãos de soja, que pode ser benéfico, pois apresenta ação antioxidante e deletérias ao organismo humano, devido ao efeito quelante em relação aos minerais divalentes. Porém, as diferentes cultivares de soja podem apresentar variação significativa no teor de ácido fítico nos grãos, em relação ao local de cultivo, aos tratamentos culturais, como a adubação com fosfatos e os fatores climáticos. Os teores de ácido fítico em grãos de soja das cultivares podem variar de 1,131 a 2,435 g/100 g. (MOREIRA et al., 2012).

A estrutura química do ácido fítico é composta por seis grupos fosfatos aniônicos, nos quais há átomos de oxigênio com elétrons livres. Esta estrutura facilita a complexação do ácido fítico com cátions divalentes como cobre, zinco, ferro e cálcio (TEIXEIRA et al., 2013). Esta complexação pode resultar na menor biodisponibilidade desses minerais no organismo, o que pode provocar efeito antinutricional (KUMAR et al., 2010).

Quanto a função antioxidante, possivelmente, esta seja responsável pelos efeitos anticarcinogênicos e antineoplásicos do ácido fítico no organismo humano (SHAMSUDDIN, 2002). Assim sendo, torna-se importante conhecer os mecanismos de ação do ácido fítico, pois é necessário conhecer os valores e os seus efeitos benéficos, para que estes possam se sobrepôr aos efeitos antinutricionais no organismo. Kumar et al. (2005) observaram que a concentração do ácido fítico é responsável pelas diferenças de função e que a concentração de ácido fítico acima de 10 %, considerada alta, faz com que esse composto atue como substância antinutricional. Porém, em concentrações mais baixas a ação funcional é a que prevalece.

### **3.1.1.4 Atividade ureática**

A análise de atividade ureática pode ser utilizada como um bom indicativo de um processo térmico eficiente ou ineficiente. A metodologia de atividade ureática se baseia no princípio de que o tratamento térmico, que for realizado adequadamente, inativa a enzima urease presente no grão de soja e, quando inativada, apresenta-se como indicativo de que os inibidores de tripsina também foram inativados. De acordo com Ramalho de Lima et al. (2011), a qualidade nutricional de alimentos está diretamente ligada à sua composição e a disponibilidade biológica de seus nutrientes, e da presença

de fatores tóxicos e antinutricionais, sendo que a maioria dos fatores são verificados através da análise da presença de atividade ureática, que é uma medida indireta da presença desses fatores. Essa medida de indicativo de desnaturação é possível devido ao fato de que a enzima urease é destruída por condições térmicas idênticas a dos inibidores de protease e lectina (SILVA, 2009).

De acordo com Ramalho de Lima et al. (2011), o adequado processamento da soja integral é avaliado por metodologia de atividade da urease, com valores de 0,05 a 0,30. Porém, resultados acima ou abaixo sugerem processamento ineficiente. Os autores ainda destacam que o grão cru da soja possui atividade ureática de 2,0 a 2,5.

### **3.2 EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA (EHS)**

De acordo com a resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA nº 14 de 28 de junho de 1978, o EHS pode ser caracterizado como o produto obtido da emulsão aquosa resultante da hidratação dos grãos de soja, limpos, seguido de processamento tecnológico adequado, adicionado ou não de ingredientes opcionais permitidos, podendo ser submetido à desidratação, parcial ou total. Sua composição química deve ser de no máximo 93,0 % de umidade, mínimo de 3,0 % de proteínas, mínimo de 2,8 % de carboidratos, mínimo de 1,0 % de lipídios e máximo de 0,6 % de cinzas (BRASIL, 1978).

Considerado um dos produtos derivados não fermentados mais conhecidos da soja, o EHS, elaborado pela primeira vez na China, durante o século II d.C., expandiu-se com o decorrer do tempo para o resto do mundo (JACKSON et al., 2002). O EHS apresenta consumo tradicional nos países asiáticos, porém, no ocidente ainda se encontra em fase de ampliação. Inicialmente, seu consumo era realizado por vegetarianos, indivíduos com restrições alimentares, ou de ordem religiosa e intolerantes à lactose (UILIANA e VENTURINI FILHO, 2010).

No momento, o consumo e aceitação, estão ligados as características sensoriais do produto, pois os benefícios do consumo são considerados importantes. Popularmente conhecido como “leite de soja”, a bebida de soja é uma alternativa valiosa no mercado de bebidas para o consumo de pessoas com intolerância à lactose, alérgica à proteína do leite de vaca, e que reduzem ou excluem alimentos de origem animal da dieta (RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2013; THEODOROPOULOS et al., 2018). Além de ser uma alternativa interessante aos lácteos, a mesma não contém colesterol e nem lactose (HATI et al., 2015).

As produções de bebidas a partir de extratos hidrossolúveis de vegetais têm sido estudadas principalmente com a finalidade de substituição de produtos de bases lácteas (GRANATO et al., 2012; ZHAO et al., 2014; BAÚ et al., 2015; VIEIRA et al., 2018b). Mas também, com o objetivo de melhorar as características sensoriais e aceitação pelo consumidor (SILVA et al., 2018). Portanto, uma das opções é a oteção de derivados que apresentam características sensoriais satisfatórias (ZAKIR e FREITAS, 2015; VIEIRA et al., 2018b).

O EHS pode ser preparado de várias maneiras, sendo que a forma tradicional é através de imersão dos grãos de soja em água por 24 h, etapa conhecida como

maceração, seguida pela trituração e filtração para obter o extrato hidrossolúvel de soja e o resíduo descartado (O'TOOLE, 2016; SILVA et al., 2018).

Nas diferentes etapas do processamento da soja (cozimento e moagem), para obtenção do EHS, a mesma é submetida a diferentes estágios de aquecimento (98, 87 a 90 °C, respectivamente) que afetam diretamente as proteínas, no entanto a intensidade do tratamento térmico apresenta-se como um fator interferente na solubilidade de suas proteínas, podendo atuar na desnaturação irreversível das mesmas (BENASSI e PRUDENCIO, 2013; HATI et al., 2015). No momento que as proteínas agregam e sedimentam, tornam-se insolúveis e podem conferir textura indesejável em bebidas e causar sensação de arenosidade ao paladar e afetar os índices de viscosidade. Outro método utilizado para melhorar as características do extrato hidrossolúvel de soja é a fermentação que possibilita o aumento da digestibilidade, melhora a nutrição e aumenta o teor de isoflavonas (XU et al., 2015).

Embora se observe o aumento na procura de soja e de seus produtos, eles normalmente são conhecidos por baixa aceitação sensorial (SILVA et al., 2018). A baixa aceitabilidade do extrato hidrossolúvel de soja (EHS) está relacionada com seu sabor e aroma desagradável ao consumidor brasileiro, principalmente, relacionado ao sabor a “feijão cru”, adstringência e presença de oligossacarídeos não digeríveis como estaquiose e rafinose. A  $\alpha$ -galactosidase é uma enzima responsável pela hidrólise destes oligossacarídeos contendo galactose. No entanto, os seres humanos são incapazes de sintetizar  $\alpha$ -galactosidase, e assim a presença destes oligossacarídeos pode dificultar a digestão e causar flatulência (CAREVIĆ et al., 2016; SINGH e VIJ, 2018).

Para diminuição do sabor de “feijão cru”, adstringência e do odor característicos da soja no EHS, podem ser aplicadas também técnicas de retirada completa da casca, a moagem com água quente, a adição de flavorizantes e a maceração dos grãos com álcalis ou ácidos (CASÉ et al., 2005) e através da maceração, moagem e aquecimento, se objetiva a inativação térmica das enzimas lipoxigenases (SCHMIDT et al., 2017), para melhorar as características sensoriais.

No Brasil, o EHS industrializado pode ser encontrado na forma original (sem aromatização), aromatizado com diferentes sabores, adoçado com sacarose ou edulcorantes, combinado com frutas diversas e, ainda, suplementado com vitaminas, açúcar e minerais, melhorando, assim, seu valor nutricional e sua aceitação no mercado (ZAKIR e FREITAS, 2015). Com extensa aplicação na indústria de alimentos o EHS, líquido ou em pó, pode ser consumido e acrescentado a uma grande variedade de produtos lácteos, como iogurtes, doce de leite, formulados infantis, sorvetes e cremes (WRIGLEY et al., 2016; VIEIRA et al., 2018a). Através da inclusão do EHS em sucos de frutas, tem-se uma mudança da atitude dos consumidores em relação aos produtos que, consumidos dessa maneira, lembram pouco o sabor original do EHS (NUNES et al., 2014).

Muitos países desenvolvidos e em desenvolvimento buscam a criação de métodos de produção em massa para alimentos tradicionais, a fim de alcançar lucros para a sobrevivência da empresa. As alterações sensoriais entre produtos tradicionais e comerciais ocorrem com facilidade e os consumidores as percebem, por isso as

pesquisas focam no desenvolvimento de versões comerciais de *commodities* alimentares tradicionais que retêm ou se assemelham a sabores tradicionais (KIM e LEE, 2014).

A fermentação é o método comumente usado para produzir vários produtos de soja, pois é comprovado que a fermentação pode melhorar a qualidade físico-química e sensorial dos produtos de soja (JAYACHANDRAN e XU, 2019). Produtos como o leite de soja, as bebidas à base de soja e o tofu são produzidos adicionando vários ingredientes à base de soja, tais como saborizantes, gomas, estabilizantes, minerais, vitaminas, açúcares, sucos de frutas e/ou agentes coagulantes em caso de tofu (PREECE et al., 2017).

Um dos produtos mais consumidos no mundo e criado a partir do EHS é o tofu, produto não fermentado, que quando consumido pode fornecer inúmeros benefícios a saúde humana (KIM et al., 2007).

### 3.3 TOFU

Tradicionalmente é consumido no oriente e países do sudeste asiático, incluindo Japão, China e Coreia, há mais de 2000 anos. Isso se deve ao seu valor nutricional, benefícios à saúde e à tendência de reduzir a ingestão de produtos de origem animal (HSIEH et al., 2014). Foi introduzido na culinária ocidental há menos de 100 anos. A fabricação de tofu com qualidade e rendimento consistentes é difícil, pois muitos fatores podem afetar o resultado, como o tipo de coagunte, a cultivar de soja e o processo de coagulação (O'Toole, 2016).

O tofu pode ser desenvolvido através de vários procedimentos que diferem entre os países. Um dos processos comumente usados para obtenção do tofu é elaborar primeiro o extrato hidrossolúvel de soja a partir de soja fresca, seguido de fervura e coagulação usando sal de cálcio ou magnésio (BELÉN et al., 2012). De acordo com Kamizake et al. (2016), o desenvolvimento do tofu ocorre em duas etapas principais. A primeira é a obtenção do extrato hidrossolúvel por maceração e moagem da soja, que após esta etapa passa por aquecimento, onde ocorre a inativação térmica das enzimas lipoxigenases. A segunda é a coagulação do extrato solúvel da soja, que é um passo importante na obtenção de uma textura adequada para o desenvolvimento do tofu (KAMIZAKE et al., 2016). A coagulação do extrato de soja solúvel pode ser realizada a partir de coagulantes animais, microbianos ou vegetais. Para o caso de atender ao consumo de indivíduos veganos, pode-se utilizar coagulantes de origem vegetal como opção de coagulação (SCHMIDT et al., 2017).

As etapas para fabricação do tofu são apresentadas na Figura 1. Todos os tipos de tofu e extrato hidrossolúvel de soja começam com a produção do extrato hidrossolúvel de soja, enquanto o okara é um subproduto da produção do extrato hidrossolúvel de soja. Para desenvolver o tofu, o extrato hidrossolúvel de soja é fervido por cerca de 10 min, e adicionado coagulante em suspensão, para formar coalhada, que é então pressionada para moldar o tofu (LIU et al., 2016).

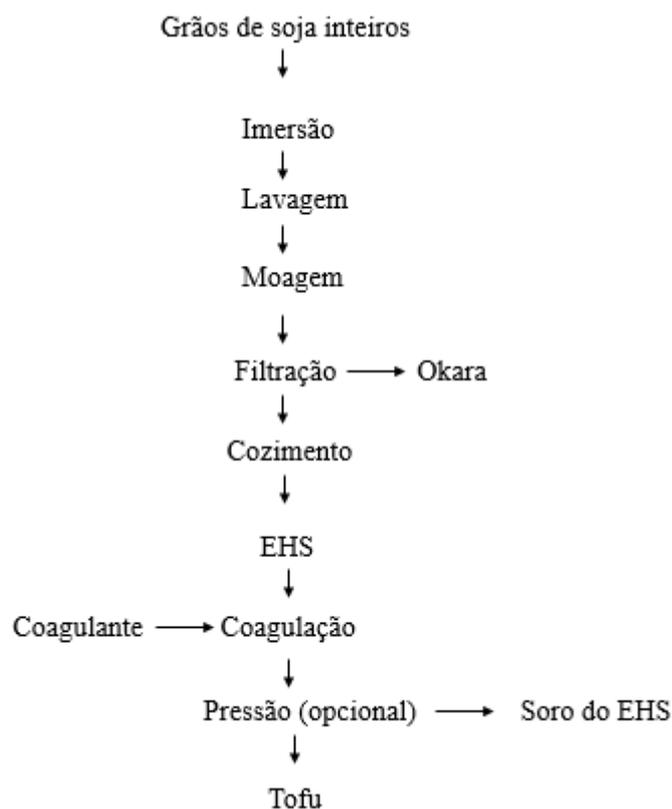


Figura 1: Etapas para obtenção de Tofu.

Fonte: Adaptada de Liu (2016).

O tofu é um produto produzido a partir da soja, é macio e semelhante ao queijo, produzido pela coagulação do Extrato Hidrossolúvel de soja recém cozido com sulfato de cálcio ou cloreto de magnésio e/ou glucona- $\delta$ -lactona (GDL) (CHUA et al., 2018). De acordo com Benassi et al. (2011), o tofu também pode ser obtido a partir dos grãos de soja e as principais etapas do processo são: maceração dos grãos em água à temperatura ambiente por 16 h; drenagem; trituração com cerca de 1 L de água quente a 90 °C, moagem (liquidificador); filtração à vácuo, em funil de Buchner forrado com tecido fino de nylon (“tunil”); aquecimento do extrato de soja em recipiente tampado, sobre o fogo direto, até a fervura, seguido de mais 10 minutos, em banho-maria em ebulição; homogeneização (usando bastão de vidro) de 760 mL de extrato com solução de  $\text{CaSO}_4$  (3 g em 40 mL de água morna), adicionada de uma única vez; coagulação por 10 min a 75-76 °C; corte do coágulo; enformagem com uso de “tunil”; retirada da forma e conservação em geladeira, em recipiente fechado, contendo água até cobrir o tofu. O EHS é utilizado para a fabricação do tofu, que é similar ao queijo produzido do leite, apresentando também a mesma consistência. A partir do EHS acontece a precipitação das proteínas através do calor e adição de coagulante, que podem ser sais ou ácidos, proporcionando um gel que apresenta a formação de uma rede proteica com retenção de água, lipídios e outros componentes, apresentando textura lisa, macia e elástica (CIABOTTI et al., 2007; CIABOTTI et al., 2009).

Além de ser um produto alimentício popular nos países asiáticos, o tofu é cada vez mais aceito pelos consumidores em todo o mundo e está ganhando popularidade nos

países ocidentais, devido a seus benefícios associados à saúde (BELÉN et al., 2012; CORZO-MARTÍNEZ et al., 2016).

No entanto nos países ocidentais, ainda se tem a necessidade de adaptar a soja ao gosto do consumidor não acostumado em utilizar a soja como alimento. O melhoramento genético da soja é uma opção para realizar esta melhoria, pois é possível a obtenção de cultivares especiais que sejam mais apropriadas a diferentes utilizações (CARRÃO-PANIZZI et al., 2012; CANTELLI et al., 2017). O gosto amargo e adstringente da soja ou o chamado *beany flavor* é causado pela oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados por enzimas lipoxigenases, porém pode ser evitado pelo tratamento térmico dos grãos antes do processamento ou através do uso de variedades sem a enzima, resultando em produtos com melhores características sensoriais (BENASSI et al., 2012).

De acordo com Rekha e Vijayalakshmi (2013) a quantidade de água utilizada na obtenção de extrato de soja afeta o teor de sólidos, atuando diretamente na recuperação das proteínas, e conseqüentemente na textura do tofu. Além disso, o aumento de sólidos proporciona um maior rendimento na obtenção dos tofus e o emprego do calor aumenta a digestibilidade das proteínas da soja devido à destruição pelo calor dos inibidores de tripsina.

O tofu é uma importante fonte de proteína, vitaminas e minerais, apresenta baixa proporção de gorduras saturadas e ausência total de colesterol, considerado um alimento saudável, de alto valor nutritivo e de custo reduzido, utilizado em preparações alimentícias, em substituição de ovos, queijos, carnes e outros alimentos de origem animal, além disso, possui sabor suave e textura porosa (CIABOTTI et al., 2007; REKHA e VIJAYALAKSHMI, 2013; SERRAZANETTI et al., 2013). De acordo com Rekha e Vijayalakshmi (2013) o tofu é considerado um produto de baixo custo que pode substituir de maneira nutritiva alimentos como carne e queijo, além disso é livre de colesterol e apresenta-se como boa fonte de proteínas, minerais e ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), principalmente o ácido linoleico encontrado nos fosfolipídios (lecitina) da soja, assim sendo, é uma boa fonte de proteína alternativa, apresentando característica superior ao próprio grão de soja.

O tofu é um produto bastante versátil e pode ser usado para fazer muitos alimentos de estilo ocidental, como por exemplo, *cheesecake*, molhos, tortas, *cream cheese*, maionese, e almôndegas italianas (O'TOOLE, 2016).

Existem diferentes tipos de tofu no mercado, dependendo do tipo de coagulante e do teor de umidade, os quais podem ser classificados como: macio, firme e extra firme (LIU et al., 2013). A saber, o tofu *silken* é formado pela coagulação do EHS na própria embalagem de consumo, já o tofu *momen* é obtido pela quebra do coágulo, seguida pela pressão em uma forma com remoção de parte do soro. A textura do *silken* é muito macia e homogênea, enquanto a do *momen* é mais firme e menos uniforme, uma vez que o coágulo é quebrado e depois reformatado sob pressão (BENASSI e PRUDENCIO, 2013).

Há estudos que demonstram que a escolha da cultivar da soja afeta o rendimento e a qualidade do tofu, de maneira especial no tofu tipo *silken*, no qual o rendimento está diretamente relacionado à capacidade do tofu reter água. Alguns pesquisadores

correlacionam as subunidades proteicas da soja (7S e 11S) com a textura do tofu, contudo os resultados são divergentes (YANG e JAMES, 2013). De acordo com Liu et al. (2013), o tipo de cultivar de soja, a qualidade do grão dependendo das condições de cultivo da planta, o armazenamento dos grãos e as condições de processamento do tofu influenciam o rendimento, a textura e a qualidade do produto.

### 3.3.1 COAGULANTES

Após a realização da moagem da soja para a obtenção do EHS, pode-se realizar a coagulação, que é uma etapa importante na obtenção de uma textura adequada para o desenvolvimento do tofu (KAMIZAKE et al., 2016). A etapa de coagulação é a mais importante no processamento de tofu, enquanto que os diferentes tipos de coagulante podem influenciar o rendimento e a qualidade dos produtos (PRABHAKARAN et al., 2016).

A coagulação do EHS pode ser realizada a partir de coagulantes de fontes de origem animal, microbiana ou vegetal. Os coagulantes usados para solidificar o EHS incluem cloreto de magnésio, sulfato de cálcio e glucona- $\delta$ -lactona (O'Toole, 2016). Tradicionalmente, são usados os coagulantes de sal, como cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ) (ZHANG et al., 2013) e usada nas duas últimas décadas, a glucona- $\delta$ -lactona é considerada um coagulante ácido popular e resulta em um gel de proteína de soja homogêneo (RINGGENBERG et al., 2013). A transglutaminase microbiana (MTGase; EC 2.3.2.13) também é um coagulante que vem sendo utilizado (JIANG e XIONG, 2013). A textura diferenciada e a qualidade do tofu resultante do coagulante devem-se principalmente à existência de forças variadas para estabilizar a rede de gel (RINGGENBERG et al., 2013; HSIEH et al., 2014).

A coagulação do EHS pode ser realizada em presença de proteases coagulantes, estas enzimas são proteínas encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de animais, vegetais e micro-organismos (RAO et al., 1998; SOARES et al., 2015). As proteases apresentam capacidade de hidrolisar ligações peptídicas e são classificadas em dois grandes grupos: exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases agem nas proximidades das extremidades das cadeias polipeptídicas, enquanto as endopeptidases agem em áreas internas das cadeias polipeptídicas (PALMA et al., 2002; GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011). As endopeptidases ou proteinases, conforme seu mecanismo de ação, podem ainda ser divididas em: cisteíno, serino-, metalato- e aspartato protease, sendo que o nome representa uma das regiões catalíticas no sítio ativo da enzima (WHITAKER, 1994; RAWLINGS et al., 2010; GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011). As proteases compõem um dos grupos mais significativos de enzimas industriais, e uma de suas fundamentais aplicações é o desenvolvimento de queijo da indústria de laticínios (MERHEB et al., 2007).

O uso de proteases vegetais como coagulantes é importante uma vez que são enzimas naturais e seu uso para produção de queijos é apropriado para consumidores vegetarianos (PINO et al., 2009; SCHMIDT et al., 2017). O número de enzimas de origem vegetal utilizadas industrialmente ainda é pequeno, embora os extratos das plantas apresentem uso em processos industriais há muito tempo (GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011). E podem ser adquiridas a partir de fontes como frutas (kiwi,

limão, melão), raízes (rizomas de gengibre), látex (mamão, maçã) e flores tais como a flor do cardo (*Cynara cardunculus*) e cardo-estrelado (*Centaurea calcitrapa*) (FERNANDEZ-SALGUERO et al., 2002; ADETUNJI e SALAWU, 2008; DOMSALLA e MELZIG, 2008; SCHMIDT et al., 2017). Além disso, as características funcionais que os extratos das proteases vegetais possuem são essenciais para determinar o sabor e a textura dos produtos, permitindo aplicações inovadoras dessas proteases (MAZORRA-MANZANO et al., 2013).

De acordo com Cao et al. (2017) que realizaram estudo objetivando melhorar as características do tofu através de diferentes coagulantes naturais, foram testados ácido cítrico, ácido málico e ácido tartárico e avaliados quanto ao armazenamento, dureza, capacidade de retenção de água, teor de água não congelável e interações hidrofóbicas em gel. A acidificação mais lenta durante a gelatinização promoveu interações proteína-proteína hidrofóbica, resultando em um módulo de elasticidade mais elevado. Além disso, os produtos de tofu apresentaram maior capacidade de retenção de água e teor de água não congelável, além de microestruturas de gel mais compactas. Notadamente, o tofu preparado com ácido cítrico quando comparado com os demais apresentou melhores resultados demonstrando que tofu macio ou firme com propriedades físico-químicas desejáveis pode ser preparado com ácidos orgânicos se a acidificação for adequadamente controlada durante a gelificação.

A proteólise intensa em queijos produzidos com coagulantes vegetais rompe a rede de caseína, originando uma estrutura mais homogênea, aumentando a cremosidade e o amolecimento do queijo (TEJADA et al., 2007). Todavia, esta proteólise intensa provoca também excesso de ácido, sabores amargos e pode diminuir o rendimento dos queijos, desvantagens inerentes que limitam a utilização de coagulantes vegetais (ROSEIRO et al., 2003; LLORENTE et al., 2014). Os queijos desenvolvidos com coagulantes vegetais são encontrados especialmente no Mediterrâneo, países da Europa Ocidental e do Sul Africano, porém, na Espanha e em Portugal há a maior variedade e produção de queijos utilizando-se *Cynara sp.* como coagulante vegetal (ROSEIRO et al., 2003). O interesse científico em utilizar proteases vegetais e seu modo de ação em diversas proteínas dos alimentos pode resultar em melhores produtos e favorecer o desenvolvimento de novas aplicações (MERHEB et al., 2007). Diferentes coagulantes podem ser utilizados na produção de tofu de acordo com a literatura (Tabela 1).

Tabela 1 Diferentes coagulantes utilizados para desenvolvimento de tofu.

<b>Desenvolvimento de tofu com diferentes coagulantes</b>	<b>Autor e ano</b>
Sulfato de cálcio	Wang et al. (2017)
Sulfato de cálcio	Chua et al. (2017)
Sulfato de cálcio ou cloreto de magnésio e/ou glucono- $\delta$ -lactona (GDL)	Chua et al. (2018)
Kiwi, gengibre e limão	Schmidt et al. (2017)
Transglutaminase microbiana e adição de <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938	Góes-Favoni et al. (2019)
Cálice de flores secas de Roselle	Fasoyiro (2014)

### 3.3.1.1 Flor do cardo

Cardo, palavra que provém do latim *carduus*, significa "fazer sinal com a cabeça" (alusão à flor de forma ovóide apoiada no caule oscilante) (ALMEIDA et al., 2010).

O coagulante de flor do cardo é um potencial coagulante de leites e uma das espécies mais utilizadas é derivada da *Cynara cardunculus*. A aplicação deste coagulante permite a obtenção de um queijo amanteigado com características sensoriais diferenciadas devido a sua maior capacidade proteolítica, que favorece a formação de queijos com características inigualáveis e amplamente aceitas pelos consumidores (GARCÍA et al., 2011).

A flor do cardo apresenta forma tubular e cor violácea (Figura 2), que possui a enzima cinarase, também conhecida como cardosina, responsável pela coagulação do leite. A substância coagulante está na parte superior do estiole, estando a atividade coagulante restrita as pétalas e os pistilos (SAPIENTIA, 2019). Salienta-se que a propriedade coagulante do leite da planta deve-se à presença de três proteases (ciprozinas 1, 2 e 3) (ALMEIDA et al., 2010).



Figura 2: Imagem da flor do cardo (*C. cardunculus* L.)

Fonte: Martins (2009).

A utilização da flor do cardo pode ser realizada por adição direta da flor seca ao leite quente, procedendo com agitação vigorosa e filtração do leite; maceração de pequenas quantidades de flor do cardo, com água e sal até se formar uma pasta, que é dissolvida com mais água (de modo a facilitar a extração das enzimas), filtrada e adicionada diretamente no leite; ou ainda por maceração da flor de cardo seca com água e sal, inserindo a pasta em embalagem porosa e submersa no leite (MACEDO et al., 1996). De acordo com Almeida et al. (2010) a flor do cardo moída (parte lilás da planta) em quantidades que podem variar consoante a força ou o poder de coagulação da planta

(1 a 2,5 g por litro de leite, o suficiente para coagular o leite em 45 a 60 min) e com infusão de sal (20 a 35 g por litro de leite).

A flor do cardo tem sido tradicionalmente utilizada, em Portugal, na fabricação do queijo, pois é um coagulante vegetal utilizado na produção de queijos de ovelha internacionalmente reconhecidos e nos últimos anos, as indústrias de queijo, em especial as que possuem o selo DOP (Denominação de origem protegida), têm destacado a importância dos agentes coagulantes, presentes nos vegetais, para uso no leite (SAPIENTIA, 2019).

A planta do cardo pode ser encontrada na forma selvagem ou cultivada e cresce em locais rochosos, sendo esta espécie pertence à família das Asteraceae (ALMEIDA et al., 2010). Em Portugal a planta do cardo apresenta sua flor nos meses de junho, julho e agosto, depois de colhidas, as flores devem ser secas à sombra e armazenadas em locais secos, com o intuito de, posteriormente, serem utilizadas para coagulação do leite nos demais períodos do ano. Porém, a flor do cardo vai perdendo qualidade com o passar do tempo (ALMEIDA et al., 2010). Diferentes autores citam a flor do cardo como coagulante de leite bovino, ovino e caprino de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Aplicação de flor do cardo como coagulante de leite.

<b>Coagulante flor do cardo usado em leite</b>	<b>Autores e ano da publicação</b>
Queijo de leite de ovino	Fogueiro et al. (2020) Correia et al. (2014) Faion et al. (2020)
Queijo de leite bovino	Folgado e Abranches (2019) Gomes et al. (2019)
Queijo de leite de ovino e bovino	Conceição et al. (2018)
Queijo de leite de ovino e de caprino	Almeida e Simões (2018) Almeida et al. (2015)

A planta herbácea apresenta aspecto vivaz (planta perene que apresenta crescimento anual), tem um caule ereto, pode atingir cerca de um metro e meio de altura, densamente coberto por folhas basais grandes. Apresenta uma grande capacidade de adaptação climática e possui vários ciclos ao longo da sua existência. A planta do cardo cresce espontaneamente, a germinação de suas sementes inicia no final do verão, as plantas crescem e formam uma roseta de folhas, e durante o inverno apresentam estado vegetativo (SAPIENTIA, 2019).

A *C. cardunculus* é conhecida por muitos pelo seu nome comum, cardo-do-coalho, é um recurso vegetal que apresenta uma cultura multifuncional e versátil, com um amplo espectro de aplicações potenciais e, assim, é de extrema importância sua preservação e conservação. Apresenta característica ligada ao conceito de Agricultura Sustentável e a conservação dos recursos genéticos vegetais. Pode, no futuro ser usada em aplicações inovadoras como nutrição alimentar, na saúde e em cosméticos (BARRACOSA et al., 2018).

Ramos et al. (2016) enfatizam que é de grande importância realizar a avaliação da diversidade genética e a determinação da relação entre ecotipos, pois este

conhecimento vem a ser importante para a conservação deste recurso genético e pode aumentar a eficiência dos esforços para a valorização da espécie. A *C. cardunculus*, desde a antiguidade, é utilizada através de extrato na medicina popular para regulação do sistema hepatobiliar devido às suas reconhecidas ações hepatoprotetoras, hipocolesterolêmicas, coleréticas e anticolinestáticas.

Ferro et al. (2017) observaram a relação entre a composição fenológica e a atividade biológica, com propriedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, hepatoprotetoras e anticancerígenas, sendo que um dos componentes de interesse, a cinaropicrina é cada vez mais investigado. Pesquisadores do Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Alentejo (CEBAL) identificaram, em uma população natural de *C. cardunculus*, associações significativas entre o conteúdo em cinaropicrina e a atividade antiproliferativa *in vitro* de células de câncer de mama (FERRO et al., 2018). Outro estudo demonstrou, também, a potencialidade anticancerígena em câncer de mama dos extratos lipofílicos, nos quais o principal componente é a cinaropicrina, extinguindo a formação de colônias de células (RAMOS et al., 2016).

O género *Cynara L.* é usado em tratamentos medicinais, pelo fato de apresentar considerável teor de compostos fenólicos, o que lhe confere atividade antioxidante (DETAILLE et al., 2008), possuindo assim, capacidade de combater o envelhecimento celular (radicais livres) (GIADA e MANCINI-FILHO, 2006), prevenir doenças cardíacas, câncer, oxidação lipídica e propagação de fungos, além de atuar em processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma em diferentes alimentos (SIMÕES et al., 2000).

Além do alto valor biológico, as folhas de *C. cardunculus* apresentam um alto potencial nutricional, pois estudos demonstram que elas apresentam flavonoides e uma quantidade muito significativa de cálcio, vitamina B2 e C, bem como outros componentes nutricionais. Possui ainda um elevado teor nutritivo e um reduzido teor de hidratos de carbono (BARRACOSA et al., 2018). Porém, de acordo com Barbosa et al. (2020), mais estudos devem ser realizados para um melhor conhecimento da composição total dos compostos fenólicos e demais componentes em diversas partes das plantas do cardo.

### **3.3.1.2 Cloreto de magnésio**

O cloreto magnésio é um coagulante utilizado na produção de tofu e este afeta diretamente as características do produto. De acordo com Liu et al. (2013) foi o primeiro coagulante a ser utilizado no processamento de tofu, e é considerado o mais adequado para preservação do sabor natural da soja e obtenção de tofu firme. Em países como a China, os consumidores preferem o sabor amargo característico do cloreto de magnésio, porém ele é um coagulante de reação rápida, e, sendo assim, difícil de controlar, pois atua na formação de um tofu com característica rígida, não uniforme e com baixa retenção de água.

Demian et al. (1986) encontraram diferentes resultados para textura e microestrutura de tofu desenvolvidos com diferentes coagulantes. A glucona- $\delta$ -lactona e o sulfato de cálcio apresentaram um produto com uma textura mais fina e uniforme,

com estrutura proteica no formato de “favo de mel”, quando comparado aos coagulantes cloreto de cálcio, cloreto de magnésio e sulfato de magnésio.

O cloreto de magnésio pode ser encontrado no nigari que é um tipo de cloreto de sais que incluem nigari natural, e nigari refinado. Nigari natural é extraído da água do mar, do qual é removido a maioria ou todo o sal NaCl e água. Uma mistura de minerais naturais do mar, consiste principalmente de cloreto de magnésio mais todos os outros sais minerais da água do mar, já o Nigari refinado é uma forma relativamente pura de cristal ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) (LIU, 1997).

### **3.4 CARACTERÍSTICAS DE TEXTURA E SENSORIAIS**

Para o tofu, a principal característica de aceitação e de qualidade sensorial é a textura, que pode sofrer influência de vários fatores como a cultivar da soja, os processos tecnológicos empregados em sua obtenção, tipos de coagulantes, entre outros. Quanto aos fatores envolvidos na estruturação do tofu a proteína é o principal componente para a formação do gel e deve passar por procedimento de desnaturação térmica e coagulação por sais ou ácidos. Os sais (cátions) ou ácidos (prótons) neutralizam a carga elétrica da proteína fazendo com que as interações entre elas se tornem mais fortes que as interações proteínas-solvente, levando a agregação de forma aleatória e ocorre a coagulação (BENASSI e PRUDENCIO, 2013; GÓES-FAVONI et al., 2016).

No tofu a textura adequada depende de vários fatores que interagem entre si tornando a coagulação a etapa mais difícil do processo. A composição química da soja, quantidade de sólidos, pH, tipo e concentração do coagulante, tempo e temperatura de coagulação são alguns dos fatores que influenciam esta etapa (CIABOTTI et al., 2009; BENASSI et al., 2011).

Conforme Dutcosky (2013), a qualidade do alimento envolve três aspectos fundamentais: nutricional, sensorial e microbiológico. O aspecto qualidade sensorial é com certeza o mais intimamente ligado a escolha do produto. Assim, o constante desafio das indústrias de derivados de soja e de pesquisadores consiste na criação de produtos que sejam aceitos pelo consumidor. Para tanto, a avaliação sensorial de produtos se faz necessária para a identificação de prováveis atributos que afetam o seu consumo (DUTCOSKY, 2013), bem como para detecção de suas características que são percebidas pelos órgãos da visão, olfato, paladar, tato e audição (ABNT, 2017a).

#### **3.4.1 Perfil de textura**

A Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT define a textura como o conjunto de propriedades mecânicas, geométricas, de superfície e de corpo de um produto, perceptíveis pelos receptores cinestésicos e somestésicos e, quando apropriado, pelos receptores visuais e auditivos, a partir da primeira mordida até a deglutição final (ABNT, 2017b).

Os atributos de qualidade mais importantes, para alguns consumidores, quanto a aceitação sensorial na caracterização dos alimentos são: textura, aparência, aroma e sabor. Entre eles, a textura é crucial e afeta a decisão dos consumidores de comprar ou não esses alimentos novamente (FELLOWS, 2019). Antes do processo de digestão, os

alimentos sólidos e semi-sólidos devem ser transformados, através da mastigação, em pasta possível de deglutição. Além disso na boca deve ocorrer um efeito sinérgico da deformação mecânica via dentes e da alteração química através da interação com a saliva (BOURNE, 2004).

A textura dos alimentos será sentida como uma das formas de qualidade durante a mastigação, por isso é importante desenvolver uma análise abrangente das propriedades da textura, que pode ser usada como forma de verificação de qualidade (FELLOWS, 2019). A textura dos alimentos também pode ser avaliada de forma instrumental através da análise de perfil de textura (APT) que é um procedimento amplamente usado para analisar quantitativamente texturas alimentares, demonstrada pela primeira vez por Friedman e posteriormente alterada por Bourne (Friedman et al., 1963; Bourne, 1978). Na APT, as amostras são expostas a pelo menos duas rampas de compressão sucessivas que imitam as primeiras mastigações aplicadas em um alimento, e as forças sentidas são registradas em função do tempo (CHEN e OPARA, 2013).

Parâmetros úteis para caracterizar a textura de alimentos semi-sólidos são: dureza, elasticidade, coesividade e gomosidade. A dureza é definida como a maior força necessária para causar determinada deformação durante a primeira rampa de compressão. A elasticidade refere-se à quantidade que um material deformado é capaz de recuperar à sua condição original quando a força é removida. Coesividade é definida como o trabalho necessário para superar a ligação própria do material. Gomosidade é definida como o produto de dureza e coesividade, que se refere à energia necessária para desintegrar alimentos semi-sólidos em ponto de deglutição (YUAN e CHANG, 2007).

### **3.4.2 Caracterização sensorial de aceitabilidade e intensão de compra**

A análise sensorial é um importante instrumento no desenvolvimento de produtos. Abrange um conjunto de técnicas desenvolvidas com o intuito de avaliar um alimento quanto à sua característica sensorial, nas várias etapas de seu processo de produção. É uma ciência que objetiva estudar as percepções, sensações e reações do consumidor sobre as características dos produtos, incluindo sua aceitação ou rejeição (DUTCOSKY, 2013).

A análise sensorial é conduzida em função das respostas transmitidas pelos indivíduos em função das diversas sensações que se originam de reações fisiológicas e são respostas de estímulos específicos, gerando resultados das propriedades intrínsecas aos produtos. Para tanto é necessário que ocorra entre as partes, indivíduos e produtos, contato e interação. As sensações são medidas por efeitos psicológicos e o estímulo por processos físicos e químicos. As sensações ocasionadas podem dimensionar a intensidade, extensão, duração, qualidade, gosto ou desgosto em relação ao produto analisado. Na avaliação sensorial, os indivíduos utilizam os sentidos da visão, olfato, audição, tato e gosto, numa percepção somato-sensorial (IAL, 2008).

A aceitação sensorial de alimentos depende, principalmente, dos hábitos culturais dos consumidores, por isso, quando um novo produto é desenvolvido ou simplesmente modificado é muito importante a realização de uma avaliação com consumidores ou potenciais consumidores, pois alguns atributos como sabor e textura são muito

relevantes para a aceitação global dos produtos. A comercialização de diferentes gêneros alimentícios e o aumento das exigências do consumidor - que busca alimentos com características sensoriais satisfatórias e cada vez mais saudáveis (SIQUEIRA et al., 2013), apresenta para a indústria um cenário desafiador, pois esta precisa elaborar produtos que além de nutricionalmente eficiente, sejam também saborosos, para satisfazer o consumidor.

De acordo com a NBR5492, os métodos sensoriais dos alimentos e bebidas, são classificados em: discriminativos, descritivos e subjetivos (ABNT, 2017a). Os discriminativos são utilizados para diferenciação qualitativa e/ou quantitativa entre as amostras e compreendem os testes de diferença e sensibilidade. Os descritivos, são utilizados para descrever as amostras qualitativamente e quantitativamente. No método subjetivo ou afetivo, estima-se a opinião do consumidor em consenso com a sua preferência e/ou aceitação de um produto (DUTCOSKY, 2013).

### 3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A expansão e diversificação na cadeia da soja, bem como o melhoramento genético de cultivares, apresentam um cenário favorável para a oferta de matérias-primas com maior potencialidade de uso na alimentação humana. O desenvolvimento de cultivares de soja, com esta finalidade, precisa proporcionar características especiais, resultando em produtos com características nutricionais e sensoriais favoráveis para o consumidor, pois o consumo da soja e seus derivados pelas populações ocidentais é limitado pelo gosto amargo, sabor rançoso e adstringente desses produtos, geralmente caracterizados como sabor de feijão cru (*beany flavor*). Nesse contexto, a aplicação de cultivares melhoradas para o desenvolvimento de produtos a base de soja tem motivado a produção de derivados como o tofu. Ainda, a fim de manter o apelo vegano do produto, o uso de coagulante de fonte vegetal vem de encontro a demanda de mercado por alimentos inovadores. De acordo com o que foi exposto na revisão da literatura ainda não foi desenvolvido tofu com uso de flor do cardo.

A aceitação de um produto depende de atributos que podem ser avaliados diretamente pelos sentidos humanos, através de testes sensoriais, como também pelo uso de instrumentos que permitam medir, diferenciar e comparar algumas de suas características. Desta forma, o desenvolvimento de tofu utilizando a soja, que é um importante alimento vegetal que contém altos teores de proteína e o coagulante natural (flor do cardo) permitirá a disponibilidade de um produto diferenciado no mercado.

### 3.6 REFERÊNCIAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Análise sensorial – Vocabulário – NBR 5492. Rio de Janeiro: ABNT, 2017a. 29 p.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Análise sensorial – Metodologia – Perfil de Textura NBR 11036. Rio de Janeiro: ABNT, 2017b. 22 p.
- ADETUNJI, V. O.; SALAWU, O. T. West African soft cheese ‘wara’ processed with *Calotropis procera* and *Carica papaya*: A comparative assessment of nutritional values. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, nº 18, p. 3360-3362, 2008. <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/59336-Article%20Text-107365-1-10-20100910.pdf>

- AGUIAR, C. L. Isoflavonas de soja e propriedades biológicas. **Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 20, nº 2, p. 323-334, 2002. <https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/1257>
- ALMEIDA, C. M.; SIMÕES, I. Cardoon-based rennets for cheese production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, nº 11, p. 4675–4686, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9032-3>
- ALMEIDA, C. M., GOMES, D., FARO, C., SIMÕES, I. Engineering a cardosin B-derived rennet for sheep and goat cheese manufacture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, nº 1, p. 269–281, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5902-5>
- ALMEIDA, D.; VENTURA, D.; PEREIRA, D.; LAGES, S. **Produção de queijo serra da estrela. Processamento Geral de Alimentos**. Escola Superior Agrária. Instituto Politécnico de Coimbra, 2010. [http://www.esac.pt/noronha/pga/0910/Trabalhos\\_mod1/Produ%C3%A7%C3%A3oQueijoSerradaEstrela.pdf](http://www.esac.pt/noronha/pga/0910/Trabalhos_mod1/Produ%C3%A7%C3%A3oQueijoSerradaEstrela.pdf)
- ANDRADE, G. F.; DANTAS, M. I. S.; PIOVESAN, N.D.; NUNES, R. M.; BARROS, E. G.; COSTA, N. M. B. Tratamento térmico adequado proporciona melhoria da qualidade nutricional de farinhas de soja elaboradas a partir de novos cultivares destinados à alimentação humana. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, nº 4, p. 537-44, 2010.
- ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES DE SOJA E MILHO DE ESTADO DE MATO GROSSO. APROSOJA. **História da Soja**. Disponível em <https://aprosojapi.com.br/sobre-a-soja/a-historia-da-soja/> Acesso em: 14 abr. 2018.
- AZEVEDO, E. Riscos e controvérsias na construção do conceito de alimento saudável: caso da soja. **Revista Saúde Pública**, v. 45, nº 4, p. 781-788, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102011000400019>
- BARBOSA, V.S.; PELUZIO, J.M.; AFFÉRI, F.S.; SIQUEIRA, G.B. Comportamento de cultivares de soja, em diferentes épocas de semeaduras, visando a produção de biocombustível. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, nº 3, p. 742-749, 2011. <http://ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/1142/599>
- BARBOSA, W. C. H.; ANDRADE, M. A.; VILARINHO, F.; CASTANHEIRA, I; FERNANDO, A. L.; LOIZZO. M. R.; SILVA, A. S. A New Insight on Cardoon: Exploring New Uses besides Cheese Making with a View to Zero. **Foods**, v. 9, nº 564, p. 1-22, 2020. <https://doi:10.3390/foods9050564>
- BARRACOSA, P.; OLIVEIRA, J.; BARROS, M.; PIRES, E. Morphological evaluation of cardoon (*Cynara cardunculus* L.): assessing biodiversity for applications based on tradition, innovation and sustainability. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 65, nº 1, p. 17–28, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0579-0>
- BAÚ, T.R.; GARCIA, S.; IDA, E.I. Changes in soymilk during fermentation with kefir culture: oligosaccharides hydrolysis and isoflavone aglycone production. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 1, p. 845-50, 2015. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1095861>
- BELÉN, F., SÁNCHEZ, J., HERNÁNDEZ, E., AULEDA, J.M., RAVENTÓS, M. One option for the management of wastewater from tofu production: Freeze concentration in a falling-film system. **Journal of food engineering**, v. 110, p. 364-373, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.12.036>
- BENASSI, V. T.; BENASSI, M. T.; PRUDENCIO, S. H. Cultivares brasileiras de soja: Características para a produção de tofu e aceitação pelo mercado consumidor. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, nº 1, p. 1901-1914, 2011. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n4Sup1p1901>

- BENASSI, V. T.; VARÉA, G. S.; PRUDENCIO, S. H. Tofus de Diferentes Cultivares de Soja: Perfil Sensorial e Correlação com as Medidas Instrumentais e de Composição Química. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, nº 4, p. 555-565, 2012. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/93243/1/tofus.benassi.pdf>
- BENASSI, V. T.; PRUDENCIO, S. H. Impactos do processamento de soja na retenção de minerais, isoflavonas e proteínas em tofus. **Alimentos e Nutrição – Brazilian Journal of Food and Nutrition**, Araraquara, v. 24, nº 1, p. 51-59, 2013. <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/969409/1/impactos.benassi.2013.pdf>
- BENEVIDES, C. M. J.; SOUZA, M. V.; SOUZA, R. D. B.; LOPES, M. V. Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, nº 2, p. 67-79, 2011. <https://doi.org/10.20396/san.v18i2.8634679>
- BRASIL. Vigilância Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde. Resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA nº 14, de 28 de junho de 1978. Extrato de Soja. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 28 jun. 1978.
- BRUNE, M. F. S. S.; PINTO, M. O.; PELUZIO, M. C. G.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Avaliação bioquímico-nutricional de uma linhagem de soja livre do inibidor de tripsina Kunitz e de lectinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, nº 3, p. 657-663, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000300014>
- BOURNE, M. C. Texture Profile Analysis [Food Acceptability]. *Food technology*, 1978.
- BOURNE, M. C. Relation between texture and mastication. **Journal of Texture Studies**, v. 35, nº 2, p. 125-143, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2004.tb00829.x>
- CAO, F. ; LI, X.; LUO, S.; MU, D.; ZHONG, X.; JIANG, S.; ZHENG, Z.; ZHAO, S. Effects of organic acid coagulants on the physical properties of and chemical interactions in tofu. **Food Science and Technology**, v. 85, p. 58-65, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.005>
- CAMPEÃO, P.; SANCHES, A. C.; MACIEL, W. R. E. Mercado Internacional de Commodities Uma Análise da Participação do Brasil no Mercado Mundial de Soja entre 2008 e 2019. **Revista Desenvolvimento em Questão**, Editora Unijuí, Ano 16, n. 45, p. 76 a 92, 2020. <http://dx.doi.org/10.21527/2237-6453.2020.51.76-92>
- CANTELLI, K. C.; SCHMITD, J. T.; OLIVEIRA, M. A.; STEFFENS, J.; STEFFENS, C.; LEITE, R. S.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Brotos de linhagens genéticas de soja: avaliação das propriedades físico-químicas. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 20, p. 10, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.7416>
- CAREVIĆ, M.; BANJANAC, K.; ČOROVIĆ, M.; JAKOVETIĆ, S.; MILIVOJEVIĆ, A.; VUKAŠINOVIĆ-SEKULIĆ, M.; BEZBRADICA, D. Selection of lactic acid bacteria strain for simultaneous production of  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidases. **Zaštita Materijala**, v. 57 nº 2, p. 265-273, 2016. <https://doi.org/10.5937/ZasMat1602265C>
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. Soja: Potencial de Uso na Dieta Brasileira. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1998. 16p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 113).
- CARRÃO-PANIZZI, M. C. Melhoramento genético para obtenção de cultivares de soja mais adequados ao consumo humano. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 15, p. 330 - 340, 2001.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BERTAGNOLLI, P. F.; STRIEDER, M. L.; COSTAMILAN, L. M.; MOREIRA, J. U. V. **Melhoramento de Soja para Alimentação Humana na Embrapa Trigo – Safra Agrícola 2011/2012**. Passo Fundo/RS. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Trigo. p. 27-31,

2012. Disponível em: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do145\\_4.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do145_4.htm) Acesso em 09 de julho de 2020.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BERHOW, M.; MANDARINO, J. M. G.; OLIVEIRA, M. C. N. Environmental and genetic variation of isoflavone content of soybean seeds grown in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n° 11, p. 1444-1451, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2009001100011>
- CARRÃO-PANIZZI, M. C. **Melhoramento de cultivares de soja especiais para processamento e utilização**. Embrapa Trigo, Rod. BR 285, Km 294, CEP 99001-970 – Passo Fundo, RS, Brasil, 2013. Disponível em: [https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/148950/1/ID43800\\_AmericasICSUpalestra4.pdf](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/148950/1/ID43800_AmericasICSUpalestra4.pdf) Acesso: 07/12/2017.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. **Soja: potencial de uso na dieta Brasileira**. Londrina: Embrapa CNPSo, 1998. 16 p. (EMBRAPA CNPSo. Documentos, 113). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/460385/1/Documentos113.pdf> Acesso em: 10 de julho de 2020.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; CRANCIANINOV, W. S.; MANDARINO, J. M. G. Índice de solubilidade de nitrogênio e índice de dispersibilidade de proteína, em cultivares de soja semeadas em Londrina e Ponta Grossa, PR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 4., 2006, Londrina. Resumos... Londrina: Embrapa Soja, 2006. p. 132-133. <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/resumo-soja-1-02.pdf>
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; OLIVEIRA, M. A.; SANTOS, H. P.; MANDARINO, J. M. G.; OLIVEIRA, M. C. M. Características de vagens e grãos de cultivares de soja para utilização como edamame. Boletim de pesquisa e desenvolvimento 20. Embrapa Soja, Londrina, PR, 2018. [https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1104406/1/BOLETI\\_M20.pdf](https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1104406/1/BOLETI_M20.pdf)
- CASÉ, F.; DELIZA, R.; ROSENTHAL, A.; MANTOVANI, D.; FELBERG, I. Produção de ‘leite’ de soja enriquecido com cálcio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n° 1, p. 86-91, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000100014>
- CHEN, L.; OPARA, U.L. Approaches to analysis and modeling texture in fresh and processed foods-a review. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n° 3, p. 497-507, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.028>
- CHIBEBA, A. M.; KYEI-BOAHENC, S.; GUIMARÃES, M. F.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRI, M. Feasibility of transference of inoculation-related technologies: A case study of evaluation of soybean rhizobial strains under the agro-climatic conditions of Brazil and Mozambique. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 261, p. 230-240, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.06.037>
- CHUA, J. Y. LU, Y., LIU, S. Q. Biotransformation of soy whey into soy alcoholic beverage by four commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 262, p. 14-22, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.007>
- CHUA, J.; LU, Y.; LIU, L. Evaluation of five commercial non-*Saccharomyces* yeasts in fermentation of soy (tofu) whey into an alcoholic beverage. **Food Microbiology**, v. 76, p. 533-542, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.07.016>
- CIABOTTI, S.; BARCELOS, M. F. P.; PINHEIRO, A. C. M.; CLEMENTE, P. R.; LIMA, M. A. C. Características sensoriais e físicas de extratos e tofus de soja comum processada termicamente e livre de lipoxigenase. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n° 3, p. 643-648, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000300033>.

- CIABOTTI, S.; BARCELOS, M. F. P.; CIRILLO, M. A.; PINHEIRO, A. C. M. Sensorial and technologic properties of product similar to tofu obtained with whey and soymilk addition. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, nº 2, 346-353, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000200017>
- CLELAND, J. World population growth; past, present and future. **Environmental and Resource Economics**, v. 55, p. 543-554, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10640-013-9675-6>
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. v. 7 - Safra 2019/20 - Décimo levantamento, Brasília, p. 1-31, julho de 2020. ISSN 2318-6852. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos> Acesso em: 10 de julho de 2020.
- CONCEIÇÃO, C., MARTINS, A. P. L., ALVARENGA, N., DIAS, J., LAMY, E., GARRIDO, L., GOMES, S., FREITAS, S., BELO, A., BRÁS, T., PAULINO, A., DUARTE, M. F. Cynara cardunculus: Use in Cheesemaking and Pharmaceutical Applications. **Technological Approaches for Novel Applications in Dairy Processing**, Nurcan Koca, Intech Open. 2018. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76530>
- CORREIA, P., VITOR, A., TENREIRO, M., CORREIA, A. C., PINTO, A., CORREIA, P., MADANELO, J., VACAS, M., GUINÉ, R. Influence of Different Processing Parameters in Physical and Sensorial Properties of Serra De Estrela Cheese. **Journal of Hygienic Engineering and Design**, v. 8, p. 135-140, 2014. <http://hdl.handle.net/10400.19/2424>
- CORZO-MARTÍNEZ, M., GARCÍA-CAMPOS, G., MONTILLA, A., MORENO, F.J. Tofu whey permeate is an efficient source to enzymatically produce prebiotic fructooligosaccharides and novel fructosylated  $\alpha$ -galactosides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 4346-4352, 2016. <https://doi.org/10.1021 / acs.jafc.6b00779>
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- DEMAN, J. M.; DEMAN, L.; GUPTA, S. Texture and microstructure of soybean curd (tofu) as effected by different coagulants. **Food Microstructure**, v. 5, nº 1, p. 83-89, 1986. <https://digitalcommons.usu.edu/foodmicrostructure/vol5/iss1/11>
- DETAILLE D, SANCHEZ C, SANZ N, LOPEZ NJM, LEVERVE X, EL-MIR M. Interrelation between the inhibition of glycolytic flux by silibinin and the lowering of mitochondrial ROS production in perfused rat hepatocytes. **Life Scienc**, v. 82, p. 1070–1076, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.03.007>.
- DOMSALLA, A.; MELZIG, M. Occurrence and properties of proteases in plant latices. **Planta Medica**, v. 74, nº 7, p. 699-711, 2008. <https://doi.org/10.1055 / s-2008-1074530>
- DOS SANTOS, A. L. Sakomura, N. K.; Freitas, E. R.; Fortes, C. M. L. S.; Carrilho, E. N. V. M.; Fernandes, J. B. K. Estudo do crescimento, desempenho, rendimento de carcaça e qualidade de carne de três linhagens de frango de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, nº 5, p. 1589-1598, 2005.
- DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 4. ed. Curitiba: Champagnat, 2013. 531 p.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2004: A soja no Brasil. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/451526/tecnologias-de-producao-de-soja--regiao-central-do-brasil-2004>. Acesso em: 10 de abril de 2020.
- FAION, A. M; MENEGOTTO, A. L. L.; FERNANDES, I. A.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J.; VALDUGA, E. Production of Serra da Estrela cheese from

- ultrafiltered sheep's milk. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 32, nº 5, p. 384-390, 2020. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2020.v32.i5.2109>
- FANG, E. F.; LEUNG, H. H.; FANG, Y.; NG, T. B. The health benefits of soybeans and Bowman-Birk inhibitor concentrate. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 1, nº 8, p. 3, 2012. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000e138>
- FARIA L. A.; PELUZIO, J. M. SANTOS, W. F; SOUZA, C. M.; COLOMBO, G. A.; AFFÉRI, F. S. Oil and protein content in the grain of soybean cultivars at different sowing seasons. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 13, nº 2, p. 7, 2018. <https://doi.org/10.5039/agraria.v14i1a5625>
- FASOYIRO, S. B. Physical, chemical and sensory qualities of Roselle water extract-coagulated tofu compared with tofu from two natural coagulants. Official Journal of Nigerian Institute of **Food Science and Technology**, v. 32, nº 2, p. 97-102, 2014. [https://doi.org/10.1016/S0189-7241\(15\)30123-5](https://doi.org/10.1016/S0189-7241(15)30123-5)
- FELLOWS, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos**. 4ª edição. Princípios e Prática, Editora: Artmed, 2019.
- FERNANDEZ-SALGUERO, J.; TEJADA, L.; GÓMEZ, R. Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, nº 4, p. 464-468, 2002. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1066>
- FERRO, A. M.; RAMOS, P.; GUERREIRO, O.; JERÓNIMO, E.; PIRES, I.; CAPEL, C.; CAPEL, J.; LOZANO, R.; DUARTE, M. F.; OLIVEIRA M. M.; GONÇALVES, S. Impact of novel SNPs identified in *Cynara cardunculus* genes on functionality of proteins regulating phenylpropanoid pathway and their association with biological activities. **BMC Genomics**, v. 18, nº 1, p. 1-16, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3534-8>.
- FERRO, A., M.; RAMOS, P.; GUERRA, A.; PARREIRA, P., BRÁS, T.; GUERREIRO, O., JERÓNIMO E.; CAPEL, C., CAPEL, J.; YUSTE-LISBONA, F., J.; DUARTE, M. F.; LOZANO, R.; OLIVEIRA, M., M.; GONÇALVES, S. Haplotype analysis of the germacrene A synthase gene and association with cynaropicrin content and biological activities in *Cynara cardunculus*. **Molecular Genetics and Genomics**. v. 293, nº 2, p. 417-433, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1388-z>.
- FOGEIRO, É.; BARRACOSA, P.; OLIVEIRA, J.; WESSEL, D. Influência da Flor de Cardoon (*Cynara cardunculus* L.) e Estágio de Lactação do Floco no DOP Queijo Serra da Estrela. **Alimentos**, v. 9, nº 4, p. 386, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9040386>.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION- FAO. The future of food and agriculture: Trends and challenges, summary version. Rome: Author. 2017.
- FOLGADO, A. ABRANCHES, R. Thistle and the cheese industry: biotechnological tools for the production of enzymes for milk coagulation. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, nº 3, p. 817-828, 2019. <https://doi.org/10.19084/rca.17565>
- FREIRIA, G. H.; LIMA, W. F.; LEITE, R. S.; MANDARINO, J. M. G.; SILVA, J. B.; PRETE, C. E. C. Productivity and chemical composition of food-type soybeans sown on different dates. **Acta Scientiarum**, v. 38, nº 3, p. 371-377, 2016. <https://doi.org/10.5039/agraria.v15i2a7410>
- FRIEDMAN, H. H.; WHITNEY, J. E.; SZCZESNIAK, A. S. The texturometer - a new instrument for objective texture measurement. **Journal of Food Science**, v. 28, nº 4, 390 - 396, 1963. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1963.tb00216.x>
- GARCÍA, V; ROVIRA, S; TERUEL, R; ROA, I; LÓPEZ, M.B. Empleo de coagulantes vegetales en leche de cabra. **Anales de Veterinaria de Murcia**, v. 27, p. 73-84, 2011.
- GERLAND, P.; RAFTERY, A. E.; ŠEVČÍKOVÁ, H.; LI, N.; GU, D.; SPOORENBERG, T.; ALKEMA, L.; FOSDICK, B. K.; CHUNN, J.; LALIC, N. World population

- stabilization unlikely this century. **Science**, v. 346, p. 234–237, 2014. <https://dx.doi.org/10.1126%2Fscience.1257469>
- GIADA MLR, MANCINI J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. **UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, nº 4, p. 7-15, 2006
- GÓES-FAVONI, S.P.; DORTA, C.; SHIMITE, A.S.O; SOUZA FILHO, W.F.; SILVA, W.F. Obtenção de tofu pela ação conjunta de transglutaminase microbiana e sulfato de magnésio. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Gramado –RS: 24-27 Out 2016.
- GÓES-FAVONI, S. P.; DORTA, C.; SHIGEMATSU, E.; TANAKA, A. Y.; HINTER, M. H.; CARDOSO, J. R. Structured tofu with microbial transglutaminase and addition of lactobacillus reuteri dsm 17938. **Revista Alimentus**, nº 6, p. 75-90, 2019. [http://novosite.fatecmarilia.edu.br/arquivos/revista/Revista\\_Alimentus-Edicao\\_6.pdf](http://novosite.fatecmarilia.edu.br/arquivos/revista/Revista_Alimentus-Edicao_6.pdf)
- GOMES, S.; BELO, A.T.; ALVARENGA, N.; DIAS, J.; LAGE, P.; PINHEIRO, C.; PINTO-CRUZ, C.; BRÁS, T.; DUARTE, M.F.; MARTINS, A.P.L. Characterization of *Cynara cardunculus* L. flower from Alentejo as a coagulant agent for cheesemaking. **International Dairy Journal**, vol. 91, p. 178-184, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.09.010>
- GONZÁLEZ-RÁBADE, N.; BADILLO-CORONA, J. A.; ARANDA-BARRADAS, J. S.; OLIVER-SALVADOR, M. Production of plant proteases *in vivo* and *in vitro* – A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 983-996, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.017>
- GRANATO, D.; MASSON, M. L.; RIBEIRO, J. C. B. Sensory acceptability and physical stability evaluation of a prebiotic soy-based dessert developed with passion fruit juice. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, nº 1, p. 119-126, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000004>
- HATI, S.; VIJ, S.; SINGH, B. P.; MANDAL, S.  $\beta$ -Glucosidase activity and bioconversion of isoflavones during fermentation of soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, nº 95, p. 216-220, 2015. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6743>
- HSIEH, J.-F.; YU, C.-J.; CHANG, J.-Y.; CHEN, S.-T.; TSAI, H.-Y. Microbial transglutaminase-induced polymerization of b-conglycinin and glycinin in soymilk: a proteomics approach. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 678-685, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.08.020>
- IAL, Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo. 4ª Edição, 1ª Edição Digital, Capítulo VI, 2008, p. 1020.
- IGNÁCIO, A. H. S.; DELAFRONTA, B.; ANDREI, I. C. M.; SAKANAKA, L. S. Caracterização e análise físicoquímica do extrato de soja e extrato de café visando à formulação de uma bebida mista. Cap. 5. In: Tópicos em Ciências e Tecnologia de Alimentos: Resultados de Pesquisas Acadêmicas – Volume 4, 2019, Ana Flávia de Oliveira (organizadora), Editora Edgard Blücher Ltda.
- JACKSON, C. J. C.; DINI, J. P.; LAVANDIER, C.; RUPASINGHE, H. P. V.; FAULKNER, H.; POYSA, V.; BUZZELL, D.; DE GRANDIS, S. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1117-1123, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00323-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00323-5)
- JAYACHANDRAN, M E XU, B. An insight into the health benefits of fermented soy products. **Food Chemistry**, v. 271, p. 362–371, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.158>
- JIANG, J. e XIONG, Y. L. Extreme pH treatments enhance the structure reinforcement role of soy protein isolate and its emulsions in pork myofibrillar protein gels in the presence

- of microbial transglutaminase. **Meat Science**, v. 93, n° 3, 469-476, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.002>
- JIDEANI, V. A. **Functional properties of soybean food ingredients in food systems**. In: NG, T. B. Soybean - biochemistry, chemistry and physiology, p. 345-366, 2011. <https://doi.org/10.5772/14668>
- KAUR, S.; SHARMA, S.; DAR, B. N.; SINGH, B. Optimization of process for reduction of antinutritional factors in edible cereal brans. **Food Science and Technology International**, v.18, p. 445-454, 2012. <https://doi.org/10.1177/1082013211428236>
- KIM, Y. S.; CHOI, Y. M.; NOH, D. O.; CHO, S. Y.; SUH, H. J. The effect of oyster shell powder on the extension of the shelf life of tofu. **Food Chemistry**, v. 103, n. 1, p. 155-160, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.040>
- KIM, M. K.; LEE, K. G. Correlating consumer perception and consumer acceptability of traditional Doenjang in Korea. **Journal of Food Science**, v. 79, n° 11, p. 2330-2336, 2014. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12676>.
- KUMAR, V.; RANI, A.; RAJPAL, S.; SRIVASTAVA, G.; RAMESH, A.; JOSHI, O. P. Phytic acid in Indian soybean: genotypic variability and influence oh growing location. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 86, n° 9, p. 1523-1526, 2005. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.2151>
- KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. **Food Chemistry**, v. 120, n° 4, p. 945-959, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.052>
- LIU, K. **Soybeans as functional foods and ingredients**. Champaign, IL, USA: AOCS. 2004. Press.
- LIU, K. **Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization**. New York: Chapman & Hall, p. 557, 1997.
- LIU, H. H.; CHIEN, J. T.; KUO, M. I. Ultra high pressure homogenized soy flour for tofu making. **Food Hydrocolloids**, v. 32, p. 278-285, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.01.005> [Food Hydrocolloids 32 \(2013\) 278e285](http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.01.005)
- LIU, K. **Soja: Visão Geral**. Encyclopedia of Food Grains. Ed. 2, v. 1, p. 228-236, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00028-7>
- LLORENTE, B. E.; OBREGÓN, W. D.; AVILÉS, F. X.; CAFFINI, N. O.; VAIRO-CAVALLI, S. Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases. **Food Chemistry**, v. 159, p. 55-63, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.007>
- MOREIRA, A. A.; MANDARINO, J. M. G. NEVES-SOUZA, R. D.; LEITE, R. S.; OLIVEIRA, M. A. Teor de ácido fítico em cultivares de soja cultivados em diferentes regiões dos estados do Paraná e São Paulo. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n° 3, p. 393-398, 2012. <https://core.ac.uk/reader/45527700>
- MANDARINO, J. M. G. **Compostos antinutricionais da soja: Caracterização e propriedades funcionais**. In: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. Alimentos funcionais: Benefícios para a saúde, p. 55-80, 2008.
- MARTINS, A. P. L. O papel do cardo na tecnologia tradicional de fabrico de queijo. Efeito dos principais factores tecnológicos. Instituto Superior de Agronomia (Sector de Leite e Derivados) Edição ADREPES, 2009. <http://www.adrepes.pt/sites/default/files/publicacoes/cardos2.pdf>
- MATEOS-APARICIO, I.; REDONDO-CUENCA, A.; VILLANUEVA-SUÁREZ, M.; ZAPATA-REVILLA, M. Soybean, a promising health source. **Nutricion hospitalaria**, v. 23, n° 4, p. 305-312, 2008. <http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v23n4/revision1.pdf>

- MACEDO, A.C.; MALCATA, F.X. Changes in the Major Free Fatty Acids in Serra heese troughout Ripening, Dairy Journal, n° 6, p. 1087-1097, 1996. <https://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/6570/1/Changes%20in%20the%20major...pdf>
- MAZORRA-MANZANO, M. A.; MORENO-HERNÁNDEZ, J. M.; RAMÍREZ-SUAREZ, J.; TORRES-LLANEZ, M. J.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-CÓRDOBA, B. Sour Orange *Citrus aurantium* L. flowers: A new vegetable source of milk-clotting proteases. **LWT – Food Science and Technology**, v. 54, p. 325-330, 2013. <https://www.researchgate.net/deref/http%3A%2F%2Fdx.doi.org%2F10.1016%2Fj.lwt.2013.07.009>
- MERHEB, C.W.; CABRAL, H.; GOMES, E.; SILVA, R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**, v. 104, p. 127-131, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.010>
- MONTEIRO, M. R. P. L.; COSTA, N. M. B.; OLIVEIRA, M. G. A.; PIRES, C. V.; MOREIRA, M. A. Qualidade protéica de linhagens de soja com ausência do inibidor de 120 tripsina Kunitz e das isoenzimas lipoxigenases. **Revista de Nutrição, Campinas**, n° 17, v. 2, p. 195-205, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732004000200006>
- NUNES, J. S.; SOUSA, E. P.; CASTRO, D. S.; SILVA, L. M. M.; MOREIRA, I. S. Avaliação do perfil físico e reológico de bebida de soja sabor iogurte com polpa de morango. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n° 1, p. 229-233, 2014. <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/2714-8171-1-PB.pdf>
- OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Editora Manole, Barueri/SP, p. 373 – 374, 2006.
- ORDÓÑEZ, J. A.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnología de alimentos: Componente dos alimentos e processos**. Tradução de Fátima Murad, v. 1, p. 294. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.
- O'TOOLE, D. K. Soybean Soymilk, Tofu, and Okara. Encyclopedia of Food Grains (Segunda Edição) **Non-wheat food**, v. 3, p. 134-143, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394437-5.00130-3>.
- OLIVEIRA, E. F.; SILVA, S. O.; SILVA, J. B.; OLIVEIRA, G. B. A., CAMPOS-FILHO, P. J.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M.C. Determinação de Isoflavonas e Inibidor de Tripsina de Kunitz em Grãos e Extratos Solúveis de Soja, obtidos de Cultivares Especiais para Alimentação Humana. Embrapa Soja. Documentos, 297 (2008). Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/468332/determinacao-de-isoflavonas-e-inibidor-de-tripsina-de-kunitz-em-graos-e-extratos-soluveis-de-soja-obtidos-de-cultivares-especiais-para-alimentacao-humana> Acesso em: abril de 2020.
- OLIVEIRA, M. A.; LORINI, I.; MANDARINO, J. M. G.; BENASSI, V. T.; FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, F. A.; HIRAKURI, M. H.; LEITE, R. S.; OSTAPECHEN, C. F.; SANTOS, L. E. G. Determinação do índice de dispersibilidade de proteína (IDP) e do índice de solubilidade do nitrogênio (ISN) dos grãos de soja colhidos na safra 2014/2015. XI Jornada Acadêmica da Embrapa Soja | Resumos expandidos, 2016.
- PALMA, J. M.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; MCCARTHY, I.; DEL RIO, L. A. Plant proteases, protein degradation, and oxidative

- stress: Role of peroxisomes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 521-530, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01404-3](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01404-3)
- PAULETTO, F. B. e FOGAÇA, A. O. Evaluation of the centesimal composition of tofu and okara. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 13, nº 1, p. 85-95, 2012. <https://periodicos.ufn.edu.br/index.php/disciplinarumS/article/view/993/937>
- PELEGRINE, D. H. G.; GASPARETTO, C. A. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. **Food Science and Technology**, v. 38, nº 1, p. 77-80, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.03.013>
- PINO, A.; PRADOS, F.; GALÁN, E.; McSWEENEY, P. L. H.; FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. **Food Research International**, v. 42, p. 324-330, 2009. <https://www.researchgate.net/deref/http%3A%2F%2Fdx.doi.org%2F10.1016%2Fj.foodres.2008.12.009>
- PRABHAKARAN, M. P.; PERERA, C. O.; VALIYAVEETIL, S. Effect of different coagulants on the isoflavone levels and physical properties of prepared firm tofu. **Food Chemistry**, v. 99, nº 3, p. 492-499, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.011>
- PREECE, K. E.; HOOSHYAR, N e ZUIDAM, N. J. Whole soybean protein extraction processes: A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 43, p. 163-172, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.07.024>
- RAMALHO DE LIMA, M.; MORAIS, S. A. N., PERAZZO COSTA; F. G., GOMES PINHEIRO, S.; SILVA DANTAS, L.; CAVALCANTE, L. E. - Atividade Ureática-2011. **Departamento de Ciências Animais**. UFERSA e Universidade Federal da Paraíba - Revista eletrônica Nutritine, Artigo Número 145, publicado – Setembro/Outubro 2011. v. 8, nº 05, p. 1606-1611. Disponível em: [http://www.nutritime.com.br/arquivos\\_internos/artigos/145V8N5P16061611SET2011\\_.pdf](http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/145V8N5P16061611SET2011_.pdf). Acesso em: maio de 2020.
- RAMOS, P., A., B.; GUERRA, Â., R.; GUERREIRO, O.; SANTOS, S., A. O.; OLIVEIRA, H.; FREIRE, C., S., R.; SILVESTRE, A., J., D.; DUARTE, M., F. Antiproliferative Effects of *Cynara cardunculus* L. var. altilis (DC) Lipophilic Extracts. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 18, nº 1, p. 15, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms18010063>.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, nº 3, p.597-635, 1998. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98927/>
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 227-233, 2010. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp971>
- REKHA, C. R.; VIJAYALAKSHMI, G. Influence of processing parameters on the quality of soycurd (tofu). **Journal of Food Science and Technology**, v.50, nº 1, p. 176-180, 2013. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n1p65>
- RIGO, A. A.; DAHMER, A. M.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J.; CARRÃO-PANIZZLI, M. C. Characterization of Soybean Cultivars Genetically Improved for Human Consumption **International Journal of Food Engineering**, v. 1, n 1, p. 1-7, 2015. <https://doi.org/10.18178/ijfe.1.1.1-7>
- RINGGENBERG, E.; ALEXANDER, M., e CORREDIG, M. Effect of concentration and incubation temperature on the acid induced aggregation of soymilk. **Food Hydrocolloids**, v. 30, nº 1, p. 463-469, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.011>

- RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELOSÓ, O. Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 136, nº 1, p. 206-212, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.115>
- ROSEIRO, L. B.; BARBOSA, M.; AMES, J. M.; WILBEY, R. A. Cheesemaking with vegetable coagulants – the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, nº 2, p. 76-85, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00080.x>
- ROSSI, E. A.; ROSIER, I.; SETCHELL, K. D. R.; CARLOS, I. Z.; VENDRAMINI, R. C.; ADDALLA, L.; TALARICO, V. H.; MINTO, D. F. Quantificação de isoflavonas nas diversas etapas do processamento do “iogurte” de soja. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, nº 2, p. 93-99, 2004. [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/90-392-1-PB%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/90-392-1-PB%20(1).pdf)
- SAPIENTIA. Enzimas coagulantes do leite. Origem vegetal – *Cynara Cardunculus L.* – cardo. Disponível em: <https://sapiencia.ualg.pt/bitstream/10400.1/629/18/4%C2%BA%20Cap%C3%ADtulo%20II-%20def..pdf>. Acessado em 21/01/2019.
- SATHE, S. K. Protein solubility and functionality. In N. **Food proteins and peptides** (pp. 95-124). Editora: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2012.
- SERRAZANETTI, D.I.; NDAGIJIMANA, M.; MISEROCCHI, C.; PERILLO, L.; GUERZONI, E. Fermented tofu: Enhancement of keeping quality and sensorial properties. **Food Control**, v. 34, nº 2, p. 336-346, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.047>
- SCHMIDT, J. T.; CANTELLI, K.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J.; ZENI, J. Effects of vegetable coagulants in the production and storage of tofu. **Global Science and Technology**, v. 10, nº 01, p. 188-198, 2017 <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/897-5604-1-PB.pdf>
- SEO, S.-H., e CHO, S.-J. Changes in allergenic and antinutritional protein profiles of soybean meal during solid-state fermentation with *Bacillus subtilis*. **Food Science and Technology**, v. 70, p. 208–212, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.035>
- SHAMSUDDIN, A. M. Anti-cancer function of phytic acid. **International Journal of Food + Science and Technology**, v. 37, p. 769-782, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00620.x>
- SINGH, B. P. e VIJ, S.  $\alpha$ -Galactosidase activity and oligosaccharides reduction pattern of indigenous lactobacilli during fermentation of soy milk. **Food Bioscience**. v. 22, p. 32-37, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.01.002>
- SIQUEIRA, A. M. O.; MACHADO, E. C. L.; STAMFORD, T. L. M. Bebidas lácteas com soro de queijo e frutas. **Ciência Rural**, v. 43, nº 9, p. 1693-1700, 2013. <https://www.scielo.br/pdf/cr/v43n9/a26813cr2012-0678.pdf>
- SILVA, J. B. da; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; PRUDÊNCIO, S. H. Composição química e física de soja tipo grão e tipo alimento para o processamento de alimentos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, n, 7, p. 777-784, 2009. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/277756200>. Acesso em: 22 de março de 2020.
- SILVA, J. B.; PRUDENCIO, S.H.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; GREGORUT, C.; FONSECA, J.F.; MATTOSO, L.H.C. Study on the flavour of soybean cultivars by sensory analysis and electronic tongue. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 1630-1638, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03013.x>
- SILVA, C. F. G.; SANTOS, F. L.; SANTANA, M. V. L.; SILVA, M. V. L.; CONCEIÇÃO, T. A. Development and characterization of a soymilk Kefir-based

- functional beverage. **Food Science and Technology**, v. 38, n° 3, p. 543-550, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.10617>
- SIMÕES C. Farmacognosia da planta ao medicamento. **Tese de mestrado**. Ed Universidade UFRGS. Porto Alegre, Florianópolis, 2000.
- SOARES, E. F.; SILVA, A. C.; QUEIROZ, A. E. S. F.; GOMES, J. E. G.; HERCULANO, P. N.; MOREIRA, K. A. Potencial do látex da fruta pão (*Artocarpus aaltilis*) como agente coagulante do leite. **Ciência Rural**, v. 45, n° 1, p. 149-154, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140310>.
- TASSI, A. L. W. BENTO, J. A. C.; FERREIRA, K. C.; CALIARI, M.; SILVA, V. S. N.; PACHECO M. T. B.; IDA, E. I.; SOARES JÚNIOR, M. S. Roasting soybeans in a microwave for manufacturing chocolate dragées. **Ciência Rural**, v. 49, n° 10, 2019. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180743>.
- TEIXEIRA, E. N. M.; SILVA, J. H. V.; GOULART, C. C.; FILHO, J. J. E RIBEIRO, M. L. G. Suplementação da fitase em rações com diferentes níveis de fósforo disponível para frangos de corte. **Revista Ciência Agronômica**. v. 44, n° 2, p. 390-397, 2013. <https://www.scielo.br/pdf/rca/v44n2/v44n2a23.pdf>
- TEJADA, L.; GÓMEZ, R.; FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. Sensory characteristics of ewe milk cheese made with three types of coagulant: Calf rennet, powdered vegetable coagulant and crude aqueous extract from *Cynara cardunculus*. **Journal of Food Quality**, v. 30, p. 91-103, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2007.00108.x>
- THEODOROPOULOS, V. C. T.; TURATTI, M. A.; GREINER, R.; MACEDO, G. A.; PALLONE, J. A. M. Effect of enzymatic treatment on phytate content and mineral bioaccessibility in soy drink. **Food Research International**, v. 108, p. 68-73, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.018>
- TIAN, H.; GUO, G.; FU, X.; YAO, Y.; YUANA, L.; XIANG, A. Fabrication, properties and applications of soy-protein-based materials: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 475-490, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.110>.
- TRINDADE, E. A. DOSSIÊ PROTEÍNAS. **Food ingredients Brasil**, n. 28, 2014. [https://revista-fi.com.br/upload\\_arquivos/201606/2016060879641001464957906.pdf](https://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060879641001464957906.pdf)
- UILIANA, M. R.; VENTURINI FILHO, W. G. Análise energética de bebida mista de extrato hidrossolúvel de soja e suco de amora. **Revista Energia na Agricultura**, Butucatu, v. 25, n° 3, p. 94-103, 2010. <https://doi.org/10.17224/EnergAgric.2010v25n3p94-103>
- VIEIRA, A. F.; ROCHA, A. P. T.; SANTOS, D. C.; MORAIS, H. M. B. R.; ALMEIDA, R. D.; SILVA, S. N. Aceitabilidade e caracterização física e físico-química de doce tipo doce de leite produzido com extrato hidrossolúvel de soja. *Revista Principia, Divulgação científica e tecnológica do IFPB*, n° 42, 2018a.
- VIEIRA, J. P.; OLIVEIRA FILHO, J. G.; SANTOS, D C.; EGEA, M. B. Study of the fermentative process of soybean beverage (glycine max) added with fructose and sucralose. **Revista eixo**, v. 7, n° 1, p. 17-25, 2018b. [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/467-Texto%20do%20artigo-2395-1-10-20180629%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/467-Texto%20do%20artigo-2395-1-10-20180629%20(1).pdf)
- WANG, Y., XING, J., WANG, R., e GUO, S. The analysis of the causes of protein precipitate formation in the blanched soymilk. **Food Chemistry**, v. 218, p. 341-347, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.084>.
- WANG, T.; QIN, G.-X.; SUN, Z.-W.; ZHAO, Y. Advances of research on glycinin and  $\beta$ -conglycinin: A review of two major soybean allergenic proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, p. 850-862, 2014. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.613534>.

- WEINGARTNER, K.E. Processing, nutrition and utilization of soybeans, In: SING, S.R., RACHIE, K. & DASCHIEL, K.E. (eds). Soybeans for the tropics: research, production and utilization. Chichester, UK. Wiley-Interscience Publications. 1987.p.149-178.
- WHITAKER, J. R. The proteolytic enzymes. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**, e. 2, v. 61, n° 19, p. 469-498, 1994. <https://doi.org/10.1021/bi00896a007>.
- WRIGLEY, C. et al. Encyclopedia of Food Grains. 2. ed. Amsterdam: Lisa Tickner, 2016.
- KAMIZAKE, N.K.K.; SILVA, L.C.P.; PRUDENCIO, S.H. Effect of soybean aging on the quality of soymilk, firmness of tofu and optimum coagulant concentration. **Food Chemistry**, v. 190, p. 90-96, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.041>.
- YANG, A.; JAMES, A. T. Effects of soybean protein composition and processing conditions on silken tofu properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n° 12, p. 3065-3071, 2013. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6140>
- XU, L.; DU, B.; XU, B. A systematic, comparative study on the beneficial health components and antioxidant activities of commercially fermented soy products marketed in China. **Food Chemistry**, v. 174, p. 202-213, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.014>.
- YUAN, S.; CHANG, S.K.C. Texture profile of tofu as affected by instron parameters and sample preparation, and correlations of instron hardness and springiness with sensory scores. **Journal of Food and Science**, v. 72, n 2, p. 136 -145, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00263.x>
- ZAKIR, M. M.; FREITAS, I. R. Benefícios à saúde humana do consumo de isoflavonas em produtos derivados da soja. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 2, n° 3, p. 107-116, 2015. <http://periodicos.ifap.edu.br/index.php/JBFS/article/view/50/68>
- ZHANG, X.; LU, P.; XUE, W.; WU, D.; WEN, C.; ZHOU, Y. Digestive evaluation of soy isolate protein as affected by heat treatment and soy oil inclusion in broilers at an early age. **Animal Science Journal**, v. 87, p. 1291–1297, 2016. <https://doi.org/10.1111/asj.12575>
- ZHAO, D.; SHAH, N.P. Changes in antioxidant capacity, isoflavone profile, phenolic and vitamin contents in soymilk during extended fermentation. **Food Sci Technology**, v. 58, n° 2, p. 454-62, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.029>
- ZUO, F., PENG, X., SHI, X., e GUO, S. Effects of high-temperature pressure cooking and traditional cooking on soymilk: Protein particles formation and sensory quality. **Food Chemistry**, v. 209, p. 50-56, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.026>.

## Capítulo 1

### **ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO TEMPO E DA TEMPERATURA NA OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA DAS CULTIVARES BRS 267 E VMAX.**

Glaciela Cristina Rodrigues Da Silva Scherer, Natália Ambrósio, Ilizandra Aparecida Fernandes, Clarice Steffens, Eunice Valduga, Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi, Jamile Zeni, Juliana Steffens.

#### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da temperatura a fim de reduzir o tempo de maceração no processo de obtenção do extrato hidrossolúvel de soja (EHS) das cultivares de soja BRS 267 e Vmax. Os grãos de soja e o extrato hidrossolúvel da soja (EHS) foram caracterizados quanto à umidade, pH, cinzas, lipídios, proteína, cor, índices de solubilidade proteica, índice de dispersibilidade proteica (IDP), inibidor de tripsina Kunitz, atividade ureática, ácido fítico e composição mineral (Ca, Mg, K, Zn, Cu, Fe, Mn). Além destes parâmetros, o EHS também foi avaliado quanto a sólidos solúveis e acidez. A influência da temperatura (30,90 a 59,10 °C) e do tempo de maceração (0,36 a 11,64 h) na maceração dos grãos de soja foi avaliada por meio de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup> tendo como resposta o teor de proteína do EHS. Os grãos e o EHS da cultivar BRS 267 apresentaram maiores teores de proteína, umidade, ácido fítico, IDP, Ca e Mn, quando comparada com a Vmax. Os resultados do planejamento tornaram possível maximizar as condições de maceração para 45 °C e 6 h, com teores de proteína de 3,5 % para a BRS 267 e 3,1 % para Vmax, sendo estes teores similares ao método de maceração tradicional (16 h e 22 °C). Desta forma, foi possível reduzir em 10 h o tempo de maceração.

**Palavras-chave:** proteína, maceração tradicional, redução do tempo.

#### **ABSTRACT**

The objective of this work was to evaluate the influence of temperature in order to reduce the maceration time in the process of obtaining water-soluble soy extract (EHS) from soybean cultivars BRS 267 and Vmax. Soy beans and water-soluble soybean extract (EHS) were characterized for moisture, pH, ash, lipids, protein, color, protein

solubility index, protein dispersibility index (PDI), Kunitz trypsin inhibitor, ureatic activity, phytic acid and mineral composition (Ca, Mg, K, Zn, Cu, Fe, Mn). In addition to these parameters, the EHS was also evaluated for soluble solids and acidity. The influence of temperature (30.90 to 59.10 °C) and maceration time (0.36 to 11.64 h) on the maceration of soybeans was evaluated using a 2<sup>2</sup> Central Composite Rotational Design (DCCR) as answer the EHS protein content. The grains and EHS of cultivar BRS 267 had higher levels of protein, moisture, phytic acid, IDP, Ca and Mn, when compared to Vmax. The planning results made it possible to maximize the maceration conditions for 45 °C and 6 h, with protein contents of 3,5 % for BRS 267 and 3,1 % for Vmax, these contents being similar to the traditional maceration method (16 h, 22 °C). In this way, it was possible to reduce the maceration time by 10 h.

**Keywords:** protein, traditional maceration, time reduction.

## 1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é de grande interesse mundial devido a sua aplicação em produtos na alimentação humana e animal (MELLO e BRUM, 2020). O Brasil está entre os maiores produtores desta *commodity*, cuja produção foi 120,90 milhões de toneladas, na safra 2019/2020 (CONAB). A soja é utilizada como fonte de óleo e proteína, sendo matéria-prima para produção de proteína texturizada (ZHANG et al., 2016), extrato hidrossolúvel de soja (EHS), *tofu* (“queijo de soja”), *shoyo* (“molho de soja”), *missô*, entre outros produtos alimentícios (SCHMIDT et al., 2017).

A Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) tem desenvolvido cultivares com excelente potencial de produtividade, adaptadas às condições climáticas das regiões brasileiras (APROSOJA, 2018). A Embrapa ainda visa desenvolver cultivares que além da alta produtividade apresentem características especiais para utilização na alimentação humana, tais como diminuição do sabor característico da soja e fatores antinutricionais. Como um exemplo tem-se a cultivar BRS 267, que apresenta grãos graúdos, coloração do hilo amarela igual ao tegumento das sementes e sabor superior, e é indicada para processamento de EHS, *tofu* e farinha de soja. Já a cultivar de soja Vmax é convencional, também produzida pela Embrapa, que apresenta em sua composição as enzimas lipoxigenases (LOX) (RIGO et al., 2015).

O EHS é um produto natural derivado da soja (ESLAMI e SHIDFAR, 2019) de alto valor nutritivo, baixo custo e de fácil obtenção. Consideráveis variações são encontradas na composição do EHS, as quais podem ser atribuídas às diferenças

genéticas entre as cultivares de soja, ao estágio de desenvolvimento em que os grãos foram colhidos e às condições do ambiente de produção (SILVA et al., 2009). Diferentes métodos de processamento, entre os quais o método de extração do EHS, também colaboram com as variações observadas. Sua composição química deve ser de no máximo 93,0 % de umidade, mínimo de 3,0 % de proteínas, mínimo de 2,8 % de carboidratos, mínimo de 1,0 % de lipídios e máximo de 0,6 % de cinzas (BRASIL, 1978).

O método tradicional de produção do EHS envolve a imersão dos grãos para reidratá-los, etapa conhecida como maceração (4 a  $22\pm 2$  °C por 8 a 24 h), enxague, ressuspensão em água e moagem dos grãos (grãos de soja em água à 90 °C), seguido de filtração para separar o resíduo (*okara*) do extrato de soja (SILVA et al., 2018). Este método apesar de simples apresenta elevado tempo de processamento na etapa de maceração. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da temperatura a fim de reduzir o tempo de maceração do processo de obtenção EHS das cultivares de soja BRS 267 e Vmax.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Soja

Os grãos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) das cultivares BRS 267 e Vmax, oriundas da região de Passo Fundo – RS, foram fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa Trigo, os quais foram caracterizados em relação a umidade, pH, cinzas, lipídios, proteína, cor, índice de solubilidade proteica (ISN), índice de dispersibilidade proteica (IDP), inibidor de tripsina Kunitz (ITK), atividade ureática, ácido fítico, composição mineral (Ca, Mg, K, Zn, Cu, Fe, Mn).

### 2.2 Extrato Hidrossolúvel de Soja (EHS)

O EHS (tradicional) foi obtido pelo processamento dos grãos de soja (BRS 267 e Vmax), de acordo com metodologia adaptada de Benassi et al. (2011). Os grãos de soja (150 g) foram previamente selecionados, classificados, quantificados, lavados, foram macerados (imersos) em 500 mL de água destilada, a temperatura ambiente ( $22\pm 2$  °C) por 16 h. Posteriormente, os grãos foram drenados e quantificados novamente para avaliar a água absorvida (g de água absorvida/100 g de grãos), conforme Equação 1. Em seguida, adicionou-se à soja água destilada a 90 °C, considerando a água absorvida

pelos grãos para que completasse 1200 mL, com proporção final de 1:8 (grãos: água) (m/v). Após, foi realizada a trituração em processador industrial (M. Vitroty, modelo HP 12), durante 3 min, em velocidade média-alta. O EHS foi separado do okara (resíduo) por filtração à vácuo (Tecnal, modelo TE-058) em frasco Kitasato de 2 L e funil de Büchner (diâmetro interno de 15 cm) forrado com tecido fino de náilon (“tunil”) para retenção das partículas moídas dos grãos de soja.

$$\text{Absorção de água} = \frac{\text{g de água absorvida}}{100 \text{ g de grãos}} \quad (\text{Equação 1})$$

Os EHS (BRS 267 e Vmax) obtidos foram caracterizados quanto à umidade, pH, cinzas, lipídios, proteína, cor, índices de solubilidade proteica (ISN), índice de dispersibilidade proteica (IDP), inibidor de tripsina Kunitz (ITK), atividade ureática, ácido fítico, composição mineral (Ca, Mg, K, Zn, Cu, Fe, Mn), sólidos solúveis e acidez.

### **2.3 Influência do tempo e da temperatura na etapa de maceração na obtenção do EHS**

Visando a redução do tempo de maceração na obtenção do EHS, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional  $2^2$  (DCCR), variando os níveis de temperatura (30,90 a 59,10 °C) e tempo (0,36 a 11,64 h), e mantendo-se fixas as variáveis de grãos de soja (150 g) e de água destilada (500 mL). Os EHS (BRS 267 e Vmax) foram caracterizados quanto ao teor de proteína e a partir da melhor condição de maceração foram caracterizadas as frações proteicas.

### **2.4 Determinações analíticas dos grãos e do EHS**

Antes de realizar as determinações analíticas, os grãos de soja *in natura* das cultivares BRS 267 e Vmax foram previamente selecionados, limpos e triturados em moinho (Cuisinart, modelo DCG-20BKN) e submetidos ao peneiramento manual em peneira de 42 mesh (Bertel) correspondendo a 355 µm, armazenados sob refrigeração (8±2 °C) de acordo com AOAC (2007). Todas as determinações analíticas foram realizadas em triplicata.

#### **2.4.1 Umidade**

A umidade foi determinada em estufa com recirculação de ar (Fanem, modelo 320-SE), com aproximadamente 3,0 g de amostra a 105 °C por aproximadamente 4 h /ou até massa constante de acordo com AOAC (2007).

#### 2.4.2 pH

A leitura do pH para os grãos (triturados em água destilada) dissolvidos em água destilada na proporção de 1/10 (v/v) e para o EHS realizado diretamente em pHmetro (Digimed, modelo DM-22) de acordo com AOAC (2007).

#### 2.4.3 Resíduo mineral (cinzas)

O resíduo mineral dos grãos de soja e do EHS foi determinado por combustão da matéria orgânica em mufla (Lavoisier, modelo 400C), a 550 °C por aproximadamente 6 h de acordo com IAL (2008). Porém antes da combustão em mufla, as amostras (~5 g) foram pré-carbonizadas em chapa de aquecimento (VELP, modelo RC). Os resultados foram expressos em g/100 g, em base seca.

#### 2.4.4 Lipídios

A determinação de lipídios, para os grãos e EHS, foi realizada por extração em Soxhlet (Nova Ética®, modelo NT340), utilizando éter de petróleo (Química Moderna® 30-60 °C) como solvente extrator de acordo com IAL (2008). Os resultados foram expressos em g/100 g, em base seca.

#### 2.4.5 Proteínas

O teor de nitrogênio dos grãos de soja e do EHS foi determinado pelo método de Kjeldahl, utilizando o sistema digestor-destilador (VELP – UDK 126A) de acordo com IAL (2007), com o fator de conversão de nitrogênio para o teor de proteína de 6,25 para as cultivares de soja e 6,38 para os EHS. Os resultados foram expressos em g/100 g, em base seca.

#### 2.4.6 Cor

A cor dos grãos de soja e do EHS foi determinada através de colorímetro (Minolta Chroma Meter, modelo CR-400), no sistema de cor CIELAB, com os três componentes, L\* (luminosidade ou brilho) cujo valor varia entre zero (preto) e 100 (branco), e as coordenadas de cromaticidade a\* e b\* que variam de -a\* (verde) até +a\* (vermelho), e de -b\* (azul) até +b\* (amarelo) de acordo com Minolta (2006). A verificação do ajuste do equipamento foi conduzida previamente de acordo com as instruções do fabricante ( $y = 93,10$ ,  $x = 0,3158$ ,  $y = 0,3321$ ). As leituras foram realizadas

com as amostras dispostas em placa de Petri (6 cm de diâmetro), realizando-se três medidas em três pontos da placa.

#### 2.4.7 Índice de Solubilidade do Nitrogênio

A determinação do ISN dos grãos de soja e do EHS foi realizada conforme o método Ba 11-65 (AOCS, 1980), cuja técnica preconiza a agitação lenta, usando o banho (Nova Ética, modelo 501D) e centrífuga (MPW, modelo 351R). O filtrado obtido foi utilizado para a determinação de proteína bruta pelo método oficial 920.87 descrito por AOAC (2005) e determinação do nitrogênio total. O ISN foi calculado pela relação entre o nitrogênio solúvel em água e o nitrogênio total (Equação 3).

$$\%ISN = \frac{Ns \times 100}{Nt} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: Ns = Nitrogênio solúvel; Nt = Nitrogênio total (%).

#### 2.4.8 Índice de Dispersibilidade Proteica

A determinação do IDP dos grãos de soja e do EHS foi realizada de acordo com o método Ba 10-65 (AOCS, 1980) técnica considerada de rápida agitação com uso do homogeneizador (Ultra-Turrax, modelo T18) e centrífuga (MPW, modelo 351R) para extração da proteína dispersível em água, dosada pelo método 960.52 de micro-Kjeldahl descrita por AOAC (2005).

O valor do IDP é o quociente entre a proteína dispersível em água e a proteína total (Equação 4).

$$\%IDP = \frac{Ps \times 100}{Pb} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde: Ps = Proteína dispersível; Pb = Proteína (%).

#### 2.4.9 Inibidor de tripsina Kunitz

Para quantificação do inibidor de tripsina Kunitz dos grãos e do EHS foi utilizada a metodologia desenvolvida por Kakade (1974). A quantificação inibitória foi realizada por meio de ensaio enzimático utilizando-se o benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) (Sigma® - Pureza  $\geq 98$  %) como substrato para a tripsina de pâncreas bovino (Sigma), efetuado em triplicata. Alíquotas de 2 mL da solução diluída do extrato das amostras foram pipetadas em 4 tubos de ensaio (3 tubos para determinação da atividade no extrato da amostra e 1 tubo para o branco) e 2 mL de água

destilada no tubo para determinar o padrão de tripsina. Os tubos foram acondicionados em banho-maria (Marconi®, modelo MA126) à 37 °C, e em seguida foram adicionados 2 mL da solução de tripsina (0,02 mg/mL de HCl 0,001 N), com exceção do branco, e após 10 min foram adicionados 5 mL de BAPNA 0,4 mg/mL de tampão Trisma pH 8,2 (contendo 2,95 mg/mL de CaCl<sub>2</sub> dihidratado (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, Neon pureza 99,0-105,0 %), previamente aquecidos a 37 °C, e deixados os tubos em banho-maria por mais 10 min. Ao final desse período adicionou-se em todos os tubos 1 mL de ácido acético (Dinâmica, pureza 99,7 %) a 30 % (v/v) para interromper a reação. E no tubo do branco adicionou-se mais 2mL da solução de tripsina. Filtrou-se em papel Whatman nº 3 (Jprolab®) e o filtrado foi utilizado para determinação do teor dos inibidores de tripsina em uma absorvância de 410 nm em espectrofotômetro (Spectro Vision®, modelo DB-1880S).

Os resultados foram expressos como mg de inibidor de tripsina Kunitz (ITK) por g de amostra desengordurada, através da Equação 5.

$$\text{Inibidor de Tripsina Kunitz} \left( \text{mg} \frac{\text{ITK}}{\text{g}} \right) = \frac{|\text{abs padrão}| - |\text{abs amostra}|}{38 \times \text{peso da amostra}} \times 2500 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde: Abs padrão: absorvância padrão; Abs amostra: absorvância da amostra; ITK: inibidor de tripsina.

#### 2.4.10 Atividade ureática

A atividade ureática dos grãos e do EHS foi determinada através da quantificação de duas porções de exatamente 0,2 g de amostra (grãos de soja e EHS tratados hidrotérmicamente) e transferidas quantitativamente para dois tubos de ensaio (A e B). Foi adicionado volumetricamente 10 mL de solução tampão de fosfato pH 7,00 ao tubo A. Sendo agitado levemente, sem inverter, tampa-se e coloca-se em banho-maria termostatizado a 30 °C. Agitou-se levemente a cada 5 min, até completar 30 min. Após transcorrido esse tempo, foi retirado o tubo do banho e mede-se o pH do líquido sobrenadante em potenciômetro previamente calibrado. Esta foi a prova em branco.

Ao tubo B adicionou-se volumetricamente 10 mL de solução tamponada de ureia pH 7 e procedeu-se da mesma forma como foi feito no tubo A, anotando o pH da solução sobrenadante resultante. A diferença de pH entre as duas soluções é o índice de atividade ureática, de acordo com metodologia descrita por Brasil (1991). A atividade ureática é calculada pela expressão da Equação 6.

$$\text{Atividade ureática} = \text{pH da amostra B} - \text{pH da amostra A} \quad (\text{Equação 6})$$

#### 2.4.11 Ácido fítico

A determinação de ácido fítico dos grãos e do EHS foi realizada por cromatografia de troca iônica, segundo metodologia descrita por Latta e Eskin (1980), com modificações. Inicialmente, quantificou-se 1 g de amostra previamente moída em Erlenmeyer de 125 mL e adicionou-se 10 mL de solução HCl 0,8 M e submeteu-se a agitação em agitador magnético (Velp Científica®) durante 2 h. Em seguida foi centrifugado (centrífuga MPW®, modelo 351R), a 2000 rpm durante 10 min para a obtenção do sobrenadante, 2 mL deste foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água ultrapura. Em seguida, foi preparada a coluna em seringa de vidro contendo 1 cm de lã de vidro e 0,50 g de resina (Dowex®, 1x4 chloride form) e empacotou-se a coluna, lavando-se com água ultrapura até que toda a resina ficasse uniforme no fundo da coluna, descartando a água que foi utilizada. Posteriormente, foi eluído 10 mL de NaCl 0,7 M (3 s/gota) e 10 mL de água ultrapura (3 s/gota). Após, foi eluído 2 mL da amostra diluída (5 s/gota), desprezando em béquer. Foi eluído cuidadosamente 10 mL NaCl 0,1 M (3 s/gota), desprezando em béquer. Eluiu-se cuidadosamente 10 mL NaCl 0,7 M (5 s/gota), coletando-se em béquer. Em tubos de ensaio foi subdividido o líquido coletado em 3 alíquotas de 3 mL, adicionou-se 1 mL do reativo de Wade e agitou-se durante 5 s em agitador tipo "vórtex" (Phoenix®, modelo AP 56) e ejetou-se a amostra para leitura em espectrofotômetro (Spectro Vision® modelo DB-1880S) a 500 nm. Os resultados foram expressos em % (g/100 g), através da Equação 7:

$$AF(\%) = \frac{(ABS_a - ABS_w) \times F_d}{M \times F \times 10000} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde: AF (%) = Porcentagem de ácido fítico; ABS<sub>a</sub> = absorbância amostra; ABS<sub>w</sub> = absorbância Wade; F = fator da curva (diferença ABS/concentração em µg), F<sub>d</sub> = fator de diluição e M = massa da amostra, em g.

#### 2.4.12 Componentes minerais

Para a quantificação dos componentes minerais, manganês (Mn), potássio (K), zinco (Zn), magnésio (Mg), cobre (Cu), ferro (Fe) e cálcio (Ca) presentes nos grãos de soja e no EHS, em equipamento de espectrometria de absorção atômica com chama – FAAS (Varian, modelo SpectrAA 55) com digestão prévia das amostras e diluídas em ácido nítrico 0,5N. (SILVA, 2009a).

#### **2.4.13 Sólidos solúveis**

Os sólidos solúveis realizado apenas no do EHS foram determinados por refratometria de acordo com metodologia descrita por IAL (2008) utilizando-se refratômetro de Abbé (Marca Bel® Equipamentos Ltda), corrigido para 20 °C para o EHS, resultados expressos em °Brix.

#### **2.4.14 Acidez titulável**

Acidez realizada apenas no para o EHS foi determinada em graus Dornic através da titulação com hidróxido de sódio 0,1 N (acidez titulável), seguindo orientações dos métodos 016/IV e 311/IV do IAL (2008).

#### **2.4.15 Frações proteicas da massa molecular por eletroforese (SDS-PAGE)**

A SDS-PAGE, realizada no EHS foi conduzida segundo Laemmli (1970) com pequenas modificações, e foi utilizado um gel de poliacrilamida com gradiente de 5-13 g/100 g, pré-moldado em gel de eletroforese Bio-Rad Mini (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). A amostra de proteína (4,0 mg) foi dissolvida em 1,0 mL de tampão, bem misturada e deixada em descanso de um dia para outro. Após foi realizada a centrifugação a 6000 rpm por 10 min, o sobrenadante obtido (8 µL) foi carregado em cada chapa, e marcadores comerciais (Solarbio, Beijing, China) de massa molecular (11-180 kDa) foram utilizados. A eletroforese foi realizada com tampão (0,025 mol/L Tris, 0,192 mol/L de glicina, 0,1 g/100 g de SDS, pH 8,3) a 80 V seguido de 110 V quando a linha azul atinge o gel de separação. Finalmente, os géis foram corados com 0,1 g/100 mL de azul Coomassie Brilliant (R-250) por 2 h e descoloridos em solução de metanol/ácido acético/água deionizada (5:10:85, por volume) por 12 h.

### **2.5 Análise estatística**

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a nível de 95 % de confiança, utilizando o *software Statistica* (versão 5.0 StatSoft, Inc., Tulsa OK, USA).

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Caracterização dos grãos de soja *in natura* e do EHS**

O teor de umidade dos grãos das duas cultivares investigadas foram de 8,56 g/100 g (BRS 267) e 8,10 g/100 g (Vmax), apresentando diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1), considerados adequados para a manutenção das

características do grão durante o armazenamento. De acordo com Benassi e Prudêncio (2013), a umidade de 8 diferentes cultivares de soja foi investigada e os resultados obtidos variaram de 8,8 a 10,8 %. Os resultados para umidade do EHS foram de 92,57 % e 91,3 % para as cultivares BRS 267 e Vmax, respectivamente, diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre as amostras analisadas. Resultado acima do encontrado neste trabalho foi reportado por Ciabotti et al. (2007) para o extrato de soja da cultivar BRS 133, com umidade de 93,70 %.

Em relação aos valores de pH, foi possível verificar que não ocorreu diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os valores obtidos para os grãos e o EHS das diferentes cultivares, obtendo-se valores médios de 6,80 e 6,50 para grão e EHS, respectivamente (Tabela 1). Schmidt et al (2017) encontrou valor de pH (6,6) para os grãos de soja provenientes de cultivares convencionais, categoria S1, resultado que é similar ao reportado neste trabalho, porém, Boatto et al. (2010) que obteve 4,3 e 4,4 para a cultivar Embrapa 48 (soja comum) e para a cultivar BRS 213 (soja livre de lipoxigenase), respectivamente. De maneira geral, a diferença entre os valores dos trabalhos citados, podem estar ligadas às diferenças genéticas entre as cultivares de soja, ao período de desenvolvimento dos grãos no momento da colheita e com as condições de tempo e temperatura (SILVA, 2009b). Quanto ao pH do EHS Ciabotti (2004) reportou valor similar ao deste trabalho (5,53).

O teor médio de cinzas para os grãos das duas cultivares de soja (Tabela 1) diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) entre si, pois é comum a soja apresentar variação no teor de cinzas, já que, este pode sofrer influência de fatores climáticos e tipo da cultivar. Ciabotti et al. (2006) encontraram resultados abaixo do reportado por este trabalho, com resultados de 3,64 para a soja comum e 3,84 para a soja livre de lipoxigenase. Para a quantificação do conteúdo de cinzas do EHS (Tabela 1) não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as amostras, sendo os valores próximos aos resultados da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO (2011), de 0,5 g/100 g.

**Tabela 1:** Caracterização dos grãos *in natura* e do Extrato Hidrossolúvel de Soja –EHS das cultivares de soja BRS 267 e Vmax.

Composição	Grãos <i>in natura</i>		EHS	
	BRS 267	Vmax	BRS 267	Vmax
Umidade (g/100 g)	8,56 <sup>a</sup> ± 0,45	8,10 <sup>b</sup> ± 0,61	92,57 <sup>a</sup> ±0,06	91,30 <sup>b</sup> ±0,10
pH	6,09 <sup>a</sup> ±0,02	6,07 <sup>a</sup> ±0,03	6,45 <sup>a</sup> ±0,03	6,56 <sup>a</sup> ±0,12
Cinzas (g/100 g)	5,09 <sup>a</sup> ± 0,06	4,55 <sup>b</sup> ± 0,12	0,41 <sup>a</sup> ±0,06	0,42 <sup>a</sup> ±0,01
Lipídios (g/100 g)	16,10 <sup>b</sup> ± 0,26	17,63 <sup>a</sup> ± 0,51	2,00 <sup>b</sup> ±0,11	2,30 <sup>a</sup> ±0,10
Proteína bruta (g/100 g)	40,09 <sup>a</sup> ± 0,31	35,22 <sup>b</sup> ±0,87	3,43 <sup>a</sup> ±0,03	3,05 <sup>b</sup> ±0,03
L*	89,7 <sup>b</sup> ±0,25	90,2 <sup>a</sup> ±0,05	72,39 <sup>b</sup> ±0,09	76,72 <sup>a</sup> ±0,22
*Cor				
a*	-0,51 <sup>a</sup> ±0,03	-0,49 <sup>a</sup> ±0,56	0,16 <sup>a</sup> ±0,06	0,19 <sup>a</sup> ±0,03
b*	21,00 <sup>b</sup> ±0,03	23,00 <sup>a</sup> ±0,37	10,09 <sup>b</sup> ±0,03	11,82 <sup>a</sup> ±0,06
ISN (g/100 g)	65,18 <sup>a</sup> ± 0,85	65,24 <sup>a</sup> ± 0,28	55,19 <sup>b</sup> ±0,06	56,19 <sup>a</sup> ±0,09
IDP (g/100 g)	82,92 <sup>a</sup> ±0,68	77,59 <sup>b</sup> ±0,45	65,24 <sup>a</sup> ±0,05	64,87 <sup>b</sup> ±0,06
Inibidor de tripsina Kunitz (mg.IT/g)	17,96 <sup>a</sup> ±0,87	18,46 <sup>a</sup> ±1,31	2,10 <sup>a</sup> ±0,25	2,13 <sup>a</sup> ±0,22
Atividade ureática	2,23 <sup>b</sup> ±0,02	2,36 <sup>a</sup> ±0,01	0,25 <sup>a</sup> ± 0,03	0,19 <sup>b</sup> ± 0,15
Ácido fítico (g/100 g)	1,65 <sup>a</sup> ± 0,08	1,57 <sup>a</sup> ± 0,12	1,71 <sup>a</sup> ±0,02	1,65 <sup>a</sup> ±0,05
Ca	250,66 <sup>a</sup> ±0,23	238,00 <sup>b</sup> ±0,03	189,66 <sup>a</sup> ±0,30	167,00 <sup>b</sup> ±0,01
Mg	192,50 <sup>b</sup> ±0,53	237,00 <sup>a</sup> ±0,61	248,25 <sup>b</sup> ±0,23	297,00 <sup>a</sup> ±0,51
K	1295,00 <sup>a</sup> ±0,07	1257,50 <sup>a</sup> ±0,89	1487,00 <sup>a</sup> ±0,02	1437,50 <sup>a</sup> ±0,25
Componentes minerais (mg/100g)				
Zn	2,90 <sup>a</sup> ±0,57	3,00 <sup>a</sup> ±0,78	3,36 <sup>a</sup> ±0,05	3,45 <sup>a</sup> ±0,26
Cu	1,20 <sup>a</sup> ±0,20	1,10 <sup>a</sup> ±0,20	1,62 <sup>a</sup> ±0,05	1,57 <sup>a</sup> ±0,30
Fe	11,33 <sup>a</sup> ±0,27	10,66 <sup>a</sup> ±0,57	9,33 <sup>a</sup> ±0,15	8,66 <sup>a</sup> ±0,13
Mn	1,75 <sup>b</sup> ±0,57	2,50 <sup>a</sup> ±0,63	2,03 <sup>b</sup> ±0,23	2,75 <sup>a</sup> ±0,05
Sólidos solúveis (°Brix)	-	-	5,40 <sup>a</sup> ±0,06	5,10 <sup>b</sup> ±0,05
Acidez (% de ácido láctico)	-	-	1,24 <sup>a</sup> ±0,11	1,32 <sup>a</sup> ±0,15
Absorção de água (g de água absorvida/100 g de grãos)	-	-	135,05 <sup>a</sup> ±0,12	139,81 <sup>a</sup> ±0,20

\*Cor determinada em colorímetro Minolta (modelo CR-400), L\* Luminosidade: 0=preto; 100=branco; a\* coordenada de cromaticidade: + 60 = cor vermelha; - 60 = cor verde; b\* coordenada de cromaticidade: + 60 = cor amarela; - 60 = cor azul. Média (três repetições) ± desvio padrão seguida de letras iguais minúsculas nas linhas, para cada grupo de análises, indica não haver diferença significativa em nível de 5 % (Teste de Tukey).

Já o teor de lipídios das cultivares diferiu entre si ( $p < 0,05$ ), indicando que o teor de lipídios depende da cultivar. A variação no teor lipídico entre as cultivares já era esperado, pois o tipo de cultivar é um fator que pode influenciar na composição química do grão, além de outros fatores. Os resultados do EHS em relação ao conteúdo médio de lipídios também diferiram estatisticamente entre as cultivares ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1). Os resultados obtidos nesta pesquisa, foram inferiores aos reportados por Ignácio et al. (2019) que encontrou resultados para o teor de lipídios de 18,38 g/100 g. E superiores ao encontrado por Ciabotti (2004), 15,74 g/100 g.

O conteúdo proteico das cultivares diferiu entre si ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1). Assim verifica-se que diferentes cultivares podem apresentar concentrações de proteínas variadas. E no caso da BRS 267 o conteúdo proteico mais elevado pode favorecer o seu uso como fonte de proteína.

O conteúdo proteico das cultivares Vmax foi de 35,22 g/100 g e da BRS 267 foi de 40,09 g/100 g, diferindo entre si ( $p < 0,05$ ). Assim verifica-se que diferentes cultivares podem apresentar concentrações de proteínas variadas, corroborando os resultados obtidos por Lopes et al. (2016) ao avaliar o teor proteico de 10 cultivares em duas épocas de plantio, que reportou médias de 28,7 a 37 g/100 g. Quanto ao teor de proteína do EHS que apresentou diferença significativa entre as cultivares e no caso da BRS 267 o conteúdo proteico mais elevado pode favorecer o seu uso como fonte de proteína. De acordo com Alves et al. (2012) oito diferentes cultivares, todas desenvolvidas pela Embrapa Soja e cultivadas na safra 2009/10, foram avaliadas quanto ao teor de proteína do EHS e foram encontrados resultados de 2,50 a 4,25 g/100g. A Resolução RDC n° 268, 22 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005), é o regulamento técnico para produtos proteicos de origem vegetal e estabelece um mínimo de 3 % de proteína para Extrato Solúvel (ES). Porém, podem ocorrer possíveis diferenças da composição química entre os ES, devido a variação de tecnologia utilizada no processamento, do volume de água utilizada na extração do ES e da cultivar da soja (TASHIMA; CARDELLO, 2003).

Ao analisar os valores médios dos parâmetros colorimétricos dos grãos de soja (*in natura*) observa-se que a luminosidade ( $L^*$ ) das amostras (Tabela 1) diferem significativamente ( $p < 0,05$ ), as duas cultivares indicaram cor amarela clara. A BRS 267 apresentou valor de  $L^*$  menor (89,7), o que caracteriza coloração mais clara para os grãos dessa cultivar, quando comparada com a Vmax, porém as duas cultivares apresentam tons marrons claros. Da mesma forma o extrato da BRS 267 (valor médio 72,39), o qual também diferiu significativamente em relação a luminosidade do EHS da

cultivar Vmax (76,72). Os extratos apresentaram índices significativamente ( $p < 0,05$ ) diferentes entre as cultivares. Ramalho et al. (2020) reportou resultados de 8 genótipos de soja convencionais com valores de  $L^*$  de 12,60 a 27,72, resultados estes inferiores ao encontrado neste trabalho. A cor dos grãos é muito importante pois está relacionada com a aceitabilidade destes e pode ser utilizada como um parâmetro importante na escolha do processamento de produtos desenvolvidos a partir da soja, como é o caso do extrato de soja e do tofu que possuem coloração entre o branco e amarelo claro e esta característica se relaciona à qualidade do produto (CIABOTTI et al., 2007). A coloração amarela é uma vantagem pelo fato de que cultivares de casca e hilo claros são mais adequadas para utilização na alimentação humana. (LIU et al. 1995; SILVA et al., 2009b). De acordo com Zilic et al. (2006), maiores temperatura e tempo de processamento podem interferir negativamente na variável  $L^*$ , indicando formação de pigmentos, possivelmente devido a ocorrência do processo de caramelização de açúcares ou da reação de Maillard, que pode ocorrer quando açúcares redutores são aquecidos na presença de proteínas, resultando no escurecimento dos produtos alimentícios.

Os resultados negativos para o índice  $a^*$  nos grãos *in natura*, mostram tendência para a cor verde que se modifica com o tratamento térmico aparecendo uma tendência a formação da cor vermelha, com resultados positivos para o EHS das cultivares BRS 267 e Vmax. Para os valores de  $b^*$ , tanto para os grãos (*in natura*) como para os EHS, as cultivares apresentaram diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ), sendo que o parâmetro “b” diminuiu para o EHS. Resultados similares são reportados por Pereira e Seibel (2016), que analisou a cultivar BRS 257 quanto a de cor dos EHS e os resultados do parâmetro  $a^*$  indicou que todos os extratos são esverdeados (valores negativos) e o parâmetro  $b^*$  indicou que são amarelos (valores positivos).

Em relação a solubilidade da proteína é possível verificar que o índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) não diferiu significativamente ao comparar os valores obtidos para os grãos (*in natura*) das diferentes cultivares, as quais apresentaram um valor médio de 65,21 g/100g. Resultado similar foi reportado por Schmitz et al. (2017) (65,29 g/100 g), para os grãos de soja provenientes de cultivares convencionais, categoria S1. E o resultado deste trabalho foi maior ao encontrado por Rigo et al. (2015) para a cultivar BRS 267 sem branqueamento e com casca (63,58 g/100g) e para a cultivar BRS 257 sem branqueamento e com casca (62,30 g/100g).

No entanto, ao comparar os resultados do IDP dos grãos das distintas cultivares, observa-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ), com valor superior (82,92 g/100 g) para a cultivar BRS 267 e menor para Vmax que apresentou 77,59 g/100 g. Schmitz et al. (2017) encontraram 87,59 g/100g para os grãos de soja, já Rigo et al. (2015) encontraram resultados de de 82,55 g/100g de média para as cultivares Vmax (cultivar de soja convencional), BRS 267 e BRS 257.

O ISN dos EHS da cultivar Vmax apresentou valor superior (56,19 g/100 g) em relação a BRS 267 (55,19 g/100 g). Estudos realizados por schmitz et al. (2017), reportaram resultados de 56,13 g/100g para EHS. Quanto ao IDP do EHS das cultivares BRS (65,24 g/100 g) e Vmax (64,87 g/100 g), apresentaram diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ). Resultados superiores foram reportados por Schmitz et al. (2017) (69,92 g/100 g). Os valores de IDP e de ISN são utilizados como parâmetro da funcionalidade da proteína, sendo assim quanto maior a solubilidade, menor o grau de desnaturação da proteína (RIGO et al. 2015). Assim, pode-se perceber que o uso de altas temperaturas durante a obtenção do EHS pode ter causado a diminuição da solubilidade, quando comparado com a soja *in natura*. Wang et al. (2000) reportou que o nível da solubilidade de nitrogênio da farinha de soja foi reduzindo pela aplicação de calor úmido e que, a maior redução dos índices de solubilidade ocorreu durante os primeiros 10 min de aquecimento.

Os valores de inibidor de tripsina Kunkitz (ITK) não apresentaram diferença significativa para as duas cultivares de soja estudadas. Este composto é termo-label, podendo ser reduzido por diferentes tratamentos térmicos durante o processamento da soja. A inativação do inibidor de tripsina é possível, mesmo sabendo que a BRS 267 é uma cultivar que foi desenvolvida para a alimentação humana, todas deverão passar por um processamento físico, como o calor, para estarem aptas para o consumo (ANDRADE et al. 2010). Os resultados desse trabalho mostraram uma considerável diminuição dos teores de IKT no EHS em relação a soja *in natura* (Tabela 1). Comparado ao teor original nos grãos (*in natura*), houve mais de 88 % de redução para os dois extratos hidrossolúveis. A redução do ITK pode ser devido ao processamento térmico durante a extração do EHS, pois de acordo com Preece et al. (2017) a utilização de temperatura é necessária para inativar os inibidores de tripsina.

A atividade ureática (Tabela 1) nos grãos de soja da cultivar BRS 267 foi menor do que para Vmax. Enquanto no EHS a atividade ureática foi maior para BRS 267. Porém, para ambas as cultivares observa-se uma redução da atividade ureática de 89 % e

92 %, respectivamente, para os extratos de BRS 267 e Vmax em comparação com os grãos *in natura*. Os dados apresentados neste estudo confirmam que os tratamentos hidrotérmicos da soja proporcionam a eliminação de enzimas e compostos antinutricionais (LIMA et al. 2011).

Os teores de ácido fítico nos grãos e no EHS não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ), para cada grupo, e os resultados foram inferiores a 2 %, o que pode caracterizar a soja como alimento funcional, pois segundo Kumar et al. (2005), uma composição alta, acima de 10 %, torna esse componente uma substância antinutricional, porém em baixas concentrações tem ação funcional. De acordo com Moreira et al. (2012) a soja apresenta excelente valor nutritivo e possui compostos bioativos, como ácido fítico que pode ser benéfico, pois apresenta ação antioxidante e deletérias ao organismo humano, devido ao efeito quelante em relação aos minerais divalentes.

A estrutura química do ácido fítico é composta por seis grupos fosfatos aniônicos, nos quais há átomos de oxigênio com elétrons livres. Esta estrutura facilita a complexação do ácido fítico com cátions divalentes como cobre, zinco, ferro e cálcio (TEIXEIRA et al., 2013). Esta complexação pode resultar na menor biodisponibilidade desses minerais no organismo, o que pode provocar efeito antinutricional (KUMAR et al., 2010). Quanto a função antioxidante, possivelmente, esta seja responsável pelos efeitos anticarcinogênicos e antineoplásicos do ácido fítico no organismo humano (SHAMSUDDIN et al., 2002). Assim, torna-se importante compreender os mecanismos de ação do ácido fítico, pois é necessário obter os valores e os seus efeitos benéficos, para que estes possam se sobrepor aos efeitos antinutricionais no organismo.

Quanto aos valores de minerais Fe, Cu, K e Zn (Tabela 1), não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) para grãos de soja (*in natura*) e EHS das cultivares BRS 267 e Vmax. Porém, Ca, Mn e Mg foram estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) para cada grupo analisado. É possível observar que em relação aos minerais, o K foi o mineral que apresentou maior quantidade, sendo maior para a cultivar BRS 267. Conseqüentemente, para o EHS (Tabela 1) os valores de K também foram maiores que os demais minerais. A composição de cálcio da soja é significativa, porém, para o EHS os valores de cálcio diminuíram quando comparados a soja *in natura*, mas ainda apresentaram resultados expressivos. Assim, os derivados de soja podem ser consumidos por seres humanos para suprir estes minerais.

Os valores dos sólidos solúveis do EHS apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras (Tabela 1), sendo maior para a BRS 267 quando comparada

com a Vmax. De acordo com Ignácio et al. (2019) valor maior foi encontrado para sólidos solúveis totais do extrato de soja liofilizado (5,9 °Brix).

A acidez do EHS não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para as cultivares BRS 267 e Vmax. Resultados similares foram reportados por Martins et al. (2013) que foi de 0,1 e 0,2 % ácido láctico. Porém resultados superiores foram encontrados por Marin et al. (2014) que obtiveram acidez de 0,46 % de ácido láctico para o EHS. A acidez é um dos parâmetros de qualidade da soja que pode influenciar nas características de seus derivados, podendo apresentar redução do rendimento do tofu porque a acidez pode atuar como um coagulante e acelerar a coagulação de proteínas (ROSSET, 2007).

A capacidade de absorção de água dos grãos foi maior para a cultivar Vmax (Tabela 1). A absorção de água pode estar ligada a característica da cultivar, que pode apresentar maior porosidade no tegumento dos grãos (BARROS NETO et al. 2014)

### 3.2 Influência do tempo e da temperatura no processo de obtenção do EHS

A Tabela 2 apresenta o teor de proteína do EHS das cultivares de soja BRS 267 e Vmax em função do tempo e temperatura no processo de obtenção do EHS, para o qual observa-se que as maiores concentrações foram acima de 3,40 g/100 g no EHS da cultivar BRS 267, e acima de 3,00 g/100 g no EHS da cultivar Vmax, empregando 45 °C e 6 h de maceração (ensaios 9, 10 e 11).

**Tabela 2:** Teor de proteína do EHS das cultivares de soja BRS 267 e Vmax em função do tempo e temperatura no processo de obtenção do EHS.

Ensaios	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Proteína* (%)	
			BRS 267	Vmax
1	-1(2)	-1(35)	2,90 ± 0,09	2,77 ± 0,25
2	1(10)	-1(35)	2,42 ± 0,27	2,46 ± 0,47
3	-1(2)	1(55)	3,22 ± 0,07	2,91 ± 0,06
4	1(10)	1(55)	2,80 ± 0,29	2,61 ± 0,35
5	-1,41(0,36)	0(45)	3,07 ± 0,09	2,85 ± 0,08
6	1,41(11,64)	0(45)	2,19 ± 0,01	2,16 ± 0,04
7	0(6)	-1,41(30,90)	2,73 ± 0,14	2,25 ± 0,06
8	0(6)	1,41(59,10)	3,14 ± 0,12	2,54 ± 0,34
9	0(6)	0(45)	3,46 ± 0,09	3,00 ± 0,05
10	0(6)	0(45)	3,43 ± 0,09	3,07 ± 0,11
11	0(6)	0(45)	3,40 ± 0,09	3,08 ± 0,12

\* variáveis independentes fixas: 150 g de grãos e 500 mL de água.

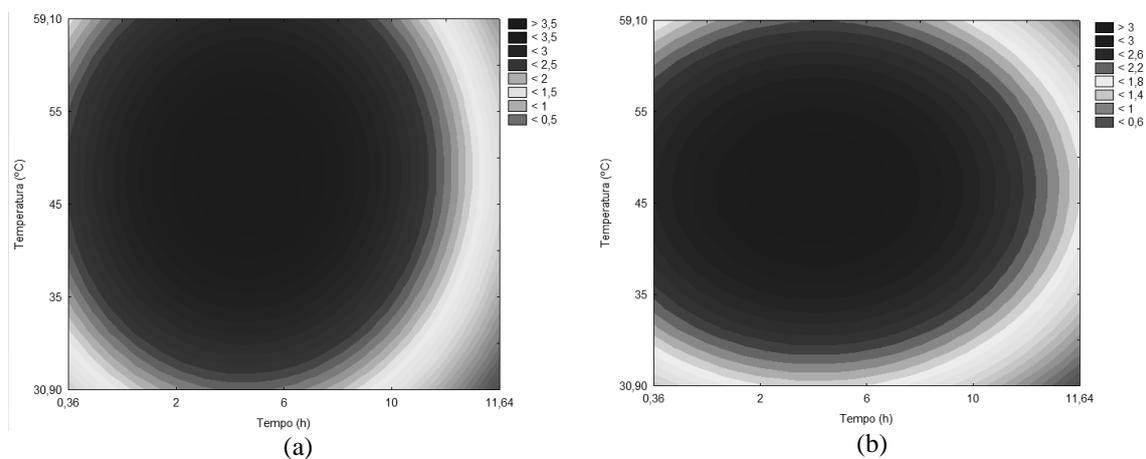
As Equações 8 e 9 apresentam os modelos codificados de segunda ordem que descrevem os teores de proteína em função das variáveis analisadas (tempo e temperatura), dentro das faixas estudadas, para a cultivar BRS 267 e Vmax, respectivamente. Os modelos foram validados pela análise de variância, pela qual obteve-se um coeficiente de correlação de 0,99 e 0,93 e o F calculado de 5,05 vezes maior que os valores tabelados para as duas cultivares BRS 267 e Vmax. Estes valores permitiram a construção das superfícies de respostas e curvas de contorno apresentadas na Figura 1.

Concentração de proteína BRS 267 (%) =  $3,43-0,53*t-0,78*t^2+0,32*T-0,47*T^2$   
(Equação 8)

Concentração de proteína Vmax (%) =  $3,05-0,40*t-0,43*t^2+0,18*T-0,54*T^2$   
(Equação 9)

Onde: t = tempo (h) e T = Temperatura (°C).

Na Figura 1 é apresentada a curva de contorno referente aos efeitos das interações entre as variáveis tempo e temperatura, na qual pode-se observar que a maximização da extração da proteína se dá com tempo na região próxima a 6 h e temperatura aproximadamente 45 °C para ambas as cultivares (BRS 267 e Vmax). Conforme Zuo et al. (2016), a intensidade do tratamento térmico pode influenciar a solubilidade das proteínas pela desnaturação e aglomeração irreversível das mesmas.

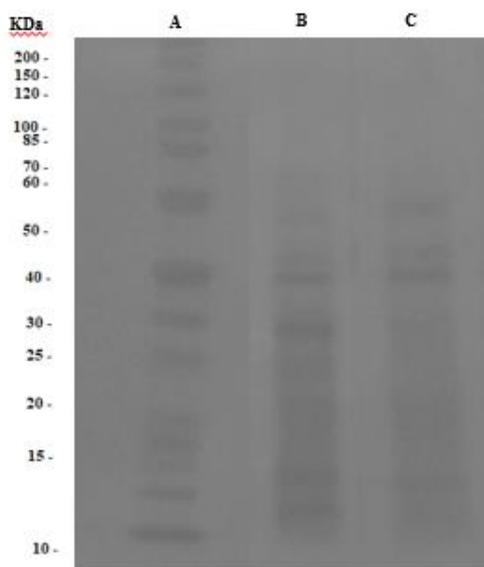


**Figura 1:** Curvas de contorno do teor de proteína em função do tempo (h) e da temperatura (°C) do processo de obtenção do EHS das cultivares BRS 267 (a) e Vmax (b).

Os teores de proteína do EHS, nos ensaios 9, 10, e 11, foram iguais ou superiores a 3 % e assim estão dentro dos padrões da legislação vigente (BRASIL, 2005), que estabelece para produtos proteicos de origem vegetal teor mínimo de 3 % de proteína para EHS na forma líquida. A proteína da soja possui alegação de propriedade funcional aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo que o consumo diário de no mínimo 25 g de proteína de soja pode ajudar a reduzir o colesterol (BRASIL, 2008).

### 3.3 Frações proteicas nos EHS

Os EHS (ponto central do planejamento) obtidos foram caracterizados em relação ao seu perfil molecular (SDS-PAGE) em condições de desnaturação (Figura 2).



**Figura 2:** SDS-PAGE de proteínas solúveis presentes em sobrenadantes obtidos a partir de: A - Marcadores de massa molecular, B - EHS da Vmax, C - EHS da BRS 267.

A partir do gel de SDS-PAGE (Coluna A- padrão albumina de soro bovino com 200 kDa de massa molecular, coluna B- EHS Vmax e C- EHS BRS 267 - Figura 2 observa-se que há frações proteicas com bandas entre 10 e 60 kDa. Com proporção maior entre 10 e 25 kDa e em 30, 40 e 50 kDa para o EHS da Vmax. No EHS da BRS 267 visualiza-se maior prevalência entre as bandas 10 e 15 kDa e entre 40 e 50 kDa. A modificação das bandas após o aquecimento, possivelmente ocorreu porque as proteínas apresentaram modificação da estrutura. De acordo com Yum et al. (2005) em

soja geneticamente modificada encontrou bandas de proteína definidas a 80 kDa e 50 kDa na soja selvagem, e uma distribuição semelhante de bandas de proteína foi observada abaixo de 40 kDa. Em outro trabalho foram reportadas bandas visíveis em 60 kDa e próximas a 12 kDa para duas linhagens comerciais não transgênicas de soja avaliadas (PANDA et al. 2013).

#### **4 CONCLUSÃO**

Os grãos de soja (*in natura*) e o EHS da cultivar BRS 267 apresentaram maiores teores de proteína, umidade, ácido fítico, IDP e composição mineral (Ca e Mn) quando comparados com a Vmax. Através do Delineamento Composto Central Rotacional 2<sup>2</sup> verificou-se que ao aumentar a temperatura de extração de 22 °C para 45 °C há uma redução de 10 h no processo de maceração dos grãos de soja das cultivares BRS e Vmax para produção do EHS com teores de proteína acima de 3 %, respeitando o que preconiza a legislação vigente quanto a este componente.

#### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio grande do Sul (FAPERGS) e a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária).

#### **REFERÊNCIAS**

- AOAC. Association Of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18th ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.
- AOAC. Association Of Official Analytical Chemists, Official Methods Of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18th ed. Washington: AOAC, 3000 p. 2007.
- AOCS. American Oil Chemist's Society. Official and tentative methods of the American Oil Chemist's Society. 3. ed. Champaing, 1980.
- ALVES, F. P.; OLIVEIRA, M. A.; LEITE, R. S.; SEIBEL, N. F. Caracterização sensorial e rendimento de extrato hidrossolúvel em cultivares de soja especiais para a alimentação humana. VI Congresso brasileiro de soja, Cuiabá, Mato Grosso, 2012.

- Associação dos Produtores de Soja e Milho de Estado de Mato Grosso. APROSOJA. História da Soja. Disponível em < <https://aprosojapi.com.br/sobre-a-soja/a-historia-da-soja/> > Acesso em: 14 abr. 2018.
- BARROS NETO, J. J. S.; ALMEIDA, F. A. C.; QUEIROGA, V. P.; GONÇALVES, C. C. Sementes estudos tecnológicos. Aracaju: Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Sergipe –IFS, Formato e-book, 2014. 285 p.
- BENASSI, V. T.; BENASSI, M. T.; PRUDENCIO, S. H. Cultivares brasileiras de soja: Características para a produção de tofu e aceitação pelo mercado consumidor. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, nº 1, p. 1901-1914, 2011.
- BENASSI, V. T.; PRUDENCIO, S. H. Impactos do processamento de soja na retenção de minerais, isoflavonas e proteínas em tofus. *Alimentos e Nutrição – **Brazilian Journal of Food and Nutrition***, Araraquara, v. 24, nº 1, p. 51-59, 2013.
- BOATTO, D. A.; MESOMO, M. C.; MADRONA, G. S.; BRANCO, I. G.; MATUMOTOPINTRO, P. T. Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo petit suisse de soja comum e de soja livre de Lipoxigenase, enriquecidos com cálcio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, nº 3, p. 766-770, 2010.
- BRASIL, Vigilância Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde. Extrato de soja. Resolução CNNPA nº 14, de 28 de junho de 1978. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, 1978.
- BRASIL, Método NE 20 Atividade Ureática. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, seção 1, p. 35, 1991.
- BRASIL. Resolução DC/ANVISA nº 268 de 22/09/2005. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico para produtos protéicos de origem vegetal. Brasília, DF, 2005. Disponível em: [https://www.normasbrasil.com.br/norma/resolucao-268-2005\\_100943.html#:~:text=Aprova%20o%20%22REGULAMENTO%20T%C3%89CNICO%20PARA,que%20lhe%20confere%20o%20art.](https://www.normasbrasil.com.br/norma/resolucao-268-2005_100943.html#:~:text=Aprova%20o%20%22REGULAMENTO%20T%C3%89CNICO%20PARA,que%20lhe%20confere%20o%20art.) Acesso em 24/04/2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Brasília, DF, 2008.
- Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. v. 7 - Safra 2019/20 - Décimo levantamento, Brasília, p. 1-31. Julho 2020. ISSN 2318-6852. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/safra-graos/boletim-da-safra-de-graos> Acesso em: 12 de julho de 2020.

- CIABOTTI, Sueli. **Aspectos tecnológicos e sensoriais do extrato de soja e respectivos tofu produzidos com cultivares de soja convencional e livre de lipoxigenase**. 122 f. Dissertação (Pós-graduação em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2004.
- CIABOTTI, S. BARCELLOS, M. F. P.; MANDARINO, J. M. G.; TARONE, A. G. Avaliações químicas e bioquímicas dos grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, nº 5, p. 920-929, 2006.
- CIABOTTI, S.; BARCELOS, M. F. P.; CIRILLO, M. A.; PINHEIRO, A. C. M.; CLEMENTE, P. R.; LIMA, M. A. C. Características sensoriais e físicas de extratos e tofus de soja comum processada termicamente e livre de lipoxigenases. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, nº 3, p. 643-648, 2007.
- ESLAMI, O.; SHIDFAR, F. Soy milk: A functional beverage with hypocholesterolemic effects? A systematic review of randomized controlled trials. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 42, p. 82–88, 2019.
- IAL. (Instituto Adolfo Lutz). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, p. 21-22, 2008.
- IGNÁCIO, A. H. S.; DELAFRONTTE, B.; ANDREI, I. C. M.; SAKANAKA, L. S. Caracterização e análise físicoquímica do extrato de soja e extrato de café visando à formulação de uma bebida mista. Cap. 5. In: Tópicos em Ciências e Tecnologia de Alimentos: Resultados de Pesquisas Acadêmicas – Volume 4, 2019, Ana Flávia de Oliveira (organizadora), Editora Edgard Blücher Ltda.
- KUMAR, V.; RANI, A.; RAJPAL, S.; SRIVASTAVA, G.; RAMESH, A.; JOSHI, O. P. Phytic acid in Indian soybean: genotypic variability and influence on growing location. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 86, nº 9, p. 1523-1526, 2005.
- KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. **Food Chemistry**, v. 120, nº 4, p. 945-959, 2010.
- LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, nº. 5259, p. 680-685, 1970.
- LATTA, M.; ESKIN, M. A simple and rapid method for phytate determination. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 28, p. 313-315, 1980.

- LIMA, M. R.; MORAIS, S. A. N.; COSTA, F. G. P.; PINHEIRO, S. G.; DANTAS, L. S.; CAVALCANTE, L. E. Atividade ureática. **Revista Eletrônica Nutritime**, Artigo 145, v. 8, nº 05, p. 1606-1611, 2011.
- LIU, K. S., ORTHOEFER, F., THOMPSON, K. The case for food-grade soybean varieties. *Inform*, 6(5), 593-599, 1995.
- LOPES, A. M. L.; PELÚZIO, J. M.; MARTINS, G. S. Teor de proteína e óleo em grãos de soja, em diferentes épocas de plantio para fins industriais. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 10, nº 3, p. 49-53, 2016.
- MARIN, M.; MADRUGA, N. A.; RODRIGUES, R. S.; MACHADO, M. R. G. Caracterização físico-química e sensorial de bebida probiótica de soja. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v.32, n.1, p.93-104, 2014.
- MARTINS, G. H.; KWIATKOWSKI, A.; BRACHT, L.; SRUTKOSKE, C. L. Q.; HAMINIUK, C. W. I. Perfil físico-químico, sensorial e reológico de iogurte elaborado com extrato hidrossolúvel de soja e suplementado com inulina. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, nº 1, p. 93-102, 2013.
- MELLO, E. S.; BRUM, A. L. The soybean productive chain and some reflections in the regional development of Rio Grande Do Sul. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, nº 10, p. 74734-74750, 2020.
- MINOLTA. The Essentials of Imaging, Manual Guide. [sl]: Minolta Co. Ltd., p. 18-21, 2006.
- MOREIRA, A. A.; MANDARINO, J. M. G. NEVES-SOUZA, R. D.; LEITE, R. S.; OLIVEIRA, M. A. Teor de ácido fítico em cultivares de soja cultivados em diferentes regiões dos estados do Paraná e São Paulo. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, nº 3, p. 393-398, 2012.
- O'TOOLE, D. K. Soybean Soymilk, Tofu, and Okara. *Encyclopedia of Food Grains* (Segunda Edição), v. 3, p. 134-143, 2016.
- PANDA, R.; ARIYARATHNA, H.; AMNUAYCHEEWA, P.; TETTEH, A.; PRAMOD, S. N.; TAYLOR, S. L.; BALLMER-WEBER, B. K.; GOODMAN, R. E. Challenges in testing genetically modified crops for potential increases in endogenous allergen expression for safety. **Allergy**, v. 68, p. 142–151, 2013.
- PEREIRA, D. G.; SEIBEL, N. F.; "Uso de Diferentes Métodos para a Obtenção do Extrato de Soja e Okara", p. 19 -36. In: **Tópicos em Ciências e Tecnologia de Alimentos: Resultados de Pesquisas Acadêmicas - Vol. 1**. São Paulo: Blucher, 2016.

- RAMALHO, J. T.; RODRIGUES, R. S.; OLIVEIRA, A. C. B. Descrição física de diferentes genótipos de soja convencionais. In: 7º simpósio de segurança alimentar, p. 1-6, out. de 2020.
- RIGO, A. A.; DAHMER, A. M.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Characterization of Soybean Cultivars Genetically Improved for Human Consumption **International Journal of Food Engineering**, v. 1, n 1, p. 1-7, 2015.
- ROSSET, Michele. **Distribuição de Ácido Fítico e Minerais durante o Processamento de Extrato Hidrossolúvel de Soja e Tofu**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina.
- SHAMSUDDIN, A. M. Anti-cancer function of phytic acid. **International Journal Food Science and Technology**, v. 37, p. 769-782, 2002.
- SCHMIDT, J. T.; CANTELLI, K.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J.; ZENI, J. Effects of vegetable coagulants in the production and storage of tofu. **Global Science and Technology**, v. 10, nº 01, p. 188-198, 2017.
- SILVA, F. C. Análise química do tecido vegetal. In: Manual de Análises Químicas de Solo, Plantas e Fertilizantes. 2 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 193- 304, 2009a.
- SILVA, J. B. D., CARRÃO-PANIZZI, M. C., PRUDÊNCIO, S. H. Chemical and physical composition of grain-type and food-type soybean for food processing. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, nº 7, p. 777-784, 2009b.
- SILVA, C. F. G.; SANTOS, F. L.; SANTANA, M. V. L.; SILVA, M. V. L.; CONCEIÇÃO, T. A. Development and characterization of a soymilk Kefir-based functional beverage. **Food Science and Technology**, p. 1-8, 2018.
- TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – 4ª edição revisada e ampliada, Campinas – São Paulo, 2011.
- TASHIMA, E. H.; CARDELLO, H. M. A. B. Perfil sensorial de extrato de hidrossolúvel de soja (Glicine Max L. Merrill) comercial adoçada com sacarose e com sucralose. B. CEPPA, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 409-428, jul./dez. 2003.
- TEIXEIRA, E. N. M; SILVA, J. H. V.; GOULART, C. C.; FILHO, J. J. E RIBEIRO, M. L. G. Suplementação da fitase em rações com diferentes níveis de fósforo disponível para frangos de corte. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, nº 2, p. 390-397, 2013.

- YUM, H. Y.; LEE, S. Y.; LEE, K. E.; SOHN, M. H.; KIM, K. E. Genetically modified and wild soybeans: an immunologic comparison. **Allergy Asthma Proc**, v. 26, n° 3, 210-216, 2005.
- WANG, S. H.; FERNANDES, S. M.; CABRAL, L. C. Solubilidade de nitrogênio, dispersibilidade de proteína e propriedades emulsificantes dos extratos hidrossolúveis desidratados de arroz e soja. **Food Science and Technology**, v. 20, n° 1, p. 2000. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612000000100003>
- ZHANG, X.; LU, P.; XUE, W.; WU, D.; WEN, C.; ZHOU, Y. Digestive evaluation of soy isolate protein as affected by heat treatment and soy oil inclusion in broilers at an early age. **Animal Science Journal**, v. 87, p. 1291–1297, 2016.
- ZILIC, S. M.; BOZÓVIC, I. N.; SAVIC, S.; SOBAJIC, S. Heat processing of soybean kernel and its effect on lysine availability and protein solubility. **Central European, Journal of Biology**, v. 1, n° 4, p. 572-583, 2006.
- ZUO, F.; PENG, X.; SHI, X.; GUO, S. Effects of high-temperature pressure cooking and traditional cooking on soymilk: Protein particles formation and sensory quality. **Food Chemistry**, v. 209, p. 50–56, 2016.

## Capítulo 2

### ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE TOFUS COM EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DAS CULTIVARES DE SOJA BRS 267 E VMAX UTILIZANDO FLOR DO CARDO (*CYNARA CARDUNCULUS* L.) COMO COAGULANTE

#### RESUMO

O objetivo do presente estudo foi desenvolver tofus com extrato hidrossolúvel de cultivares de soja, BRS 267 e Vmax, coagulados com flor do cardo (*Cynara cardunculus* L.) e cloreto de magnésio, bem como caracterizá-los quanto as propriedades físicas, químicas e microbiológicas, análise de perfil de textura, estrutura, aceitação sensorial e intenção de compra. Os teores de umidade, pH, cinzas, proteína bruta, sólidos solúveis e sinérese diminuíram com os dias de armazenamento (1º, 7º e 14º dias) e os índices de Inibidor de tripsina Kunitz, atividade ureática e ácido fítico se mantiveram inalterados para as todas as formulações de tofu elaborados com as cultivares Vmax e BRS 267 coagulados com flor do cardo e cloreto de magnésio (formulações (F1: BRS 267 e flor de cardo; F2: Vmax e flor de cardo; F3: BRS 267 e cloreto de magnésio; F4: Vmax e cloreto de magnésio). Quanto ao teor de antioxidantes as formulações F1 e F2 apresentaram resultados inferiores em relação aos seus respectivos Extrato Hidrossolúvel de Soja (EHS). A fração proteica do extrato da flor do cardo e dos tofus apresentaram bandas entre 10 e 60 kDa e de 10 a 45 kDa, respectivamente, não sendo possível diferenciar as formulações de tofu, pois a variação foi muito pequena. Através das imagens de microestrutura eletrônica de varredura, identificou-se partículas dispersas no início da coagulação e formação de coágulos nos tofus. Em relação a cor, foi possível verificar que todos os tofus apresentaram cor clara, porém foi possível diferenciar as formulações através dos parâmetros instrumentais de cor avaliados ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $\Delta E$  e  $^{\circ}\text{Hue}$ ), os quais indicaram que durante o período de armazenamento ocorreu leve amarelamento das amostras. Para o perfil de textura, observou-se que a dureza e a gomosidade apresentaram tendência de aumento e enquanto a elasticidade e coesividade tiveram tendência de redução, com o passar dos dias de armazenamento. Quanto as análises microbiológicas, as formulações de tofus atenderam a legislação vigente. Na avaliação sensorial dos tofus, as formulações F1 e F2, coaguladas com a flor do cardo, apresentaram maior aceitação sensorial e intenção de compra, demonstrando que os resultados dos tofus coagulados com flor do cardo são promissores em relação aos tofus obtidos com coagulante comercial ( $\text{MgCl}_2$ ). Os tofus apresentaram características tecnológicas e aceitação, com teores de proteína acima de 12 %, utilizando a flor do cardo, indicando que o uso do coagulante vegetal pode representar mais uma alternativa de produto para os consumidores veganos e intolerantes a lactose.

**Palavras-chave:** textura, aceitação, coagulante vegetal, veganos.

## ELABORATION AND CHARACTERIZATION OF TUFOS WITH SOY CULTIVARS BRS 267 AND VMAX USING CARD FLOWER AS COAGULANT

### ABSTRACT

The aim of the present study was to develop tofus with water-soluble extract of soybean cultivars, BRS 267 and Vmax, coagulated with thistle flower (*Cynara cardunculus* L.) and magnesium chloride, as well as to characterize them in terms of physical, chemical and microbiological properties. , texture profile analysis, structure and sensory acceptance and purchase intent. The contents of humidity, pH, ash, crude protein, soluble solids and syneresis decreased with the storage days (1st, 7th and 14th days) and the Kunitz trypsin inhibitor, urea activity and phytic acid levels remained unchanged for all tofu formulations prepared with cultivars Vmax and BRS 267 coagulated with thistle flower and magnesium chloride (formulations (F1: BRS 267 and thistle flower; F2: Vmax and thistle flower; F3: BRS 267 and magnesium chloride; F4: Vmax and magnesium chloride) Regarding the antioxidant content, the F1 and F2 formulations presented inferior results in relation to their respective Hydrosoluble Soybean Extract (EHS). The protein fraction of the thistle flower extract and the tofus presented bands between 10 and 60 kDa and 10 to 45 kDa, respectively, it is not possible to differentiate the tofu formulations, as the variation was very small. Coagulation and clot formation in tofus. Regarding color, it was possible to verify that all tofus showed light color, however it was possible to differentiate the formulations through the instrumental color parameters evaluated ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $\Delta E$  and °Hue), which indicated that during the storage period, there was a slight yellowing of the samples. For the texture profile, it was observed that the hardness and gummyness showed a tendency to increase and while the elasticity and cohesiveness had a tendency to decrease, with the passing of the storage days. Regarding microbiological analysis, tofus formulations complied with current legislation. In the sensory evaluation of tofus, F1 and F2 formulations, coagulated with thistle flower, showed greater sensory acceptance and purchase intention, demonstrating that the results of tofus coagulated with thistle flower are promising in relation to tofus obtained with commercial coagulant ( $MgCl_2$ ). The tofus showed technological characteristics and acceptance, with protein content above 12 %, using the thistle flower, indicating that the use of vegetable coagulant can represent another product alternative for vegan and lactose intolerant consumers.

**Keywords:** texture, acceptance, vegetable coagulant, vegans.

### 2.1 INTRODUÇÃO

Devido à crescente incidência de doenças na população mundial, a busca por alimentos de qualidade e que possam contribuir para melhorar o estado de saúde das pessoas é crescente. Algumas doenças estão relacionadas com fatores alimentares, como contaminação fúngica de grãos, deficiência de selênio e desequilíbrio na ingestão de proteínas (WANG et al., 2020). Os hábitos alimentares cada vez mais pobres da sociedade moderna, que está habituada ao chamado “fast food”, e que têm sido acompanhados por epidemias de obesidade e distúrbios metabólicos que aumentam

substancialmente a prevalência de condições crônicas, como é o caso de doenças cardiovasculares, que podem ser prevenidas com o consumo de diferentes alimentos (TSOUPRAS et al., 2018). Uma fonte de proteína, que se apresenta como uma alternativa interessante é a soja (*Glycine max*) que possui quantitativamente um alto teor de proteína (40 %) (CHIBEBA et al., 2018).

O consumo da soja e de seus derivados pelos humanos é limitado pelo sabor amargo, rançoso e adstringente (sabor de feijão cru ou “*beany flavor*”). Porém, de acordo com Silva et al. (2018), o interesse do consumidor por alimentos à base de soja aumentou nos últimos anos. No entanto, características sensoriais ainda dificultam a inclusão da oleaginosa na dieta e a aceitação de produtos de soja. Estas características são decorrentes da ação de lipoxigenases, enzimas que catalisam a adição de oxigênio molecular ao sistema pentadieno de ácidos graxos poliinsaturados, formando hidroperóxidos dos ácidos gordurosos correspondentes. Entretanto estas enzimas podem ser inativadas por tratamento térmico próximo de 100 °C durante 5 a 10 min (MAIA et al., 2006) ou pela utilização de cultivares de soja, desenvolvidas pelos programas de melhoramento genético, que apresentam características mais adequadas ao consumo humano, isentas das enzimas lipoxigenases, ou que apresentam sabor mais suave (CARRÃO-PANIZZI; SILVA, 2011).

Além disso, devido ao melhoramento genético da soja é possível a obtenção de cultivares especiais que possuem características apropriadas para elaboração de produtos alimentícios (CARRÃO-PANIZZI et al., 2012; CANTELLI et al., 2017). O melhoramento genético da soja além de favorecer a qualidade sensorial da soja e de seus produtos, também pode ocasionar benefícios à saúde dos consumidores ocasionando um aumento do seu consumo, estimulando assim, o desenvolvimento e oferta de produtos à base de soja com melhores características (RIGO et al. 2015). Por isso diferentes segmentos de grandes e pequenas indústrias têm formulado produtos com soja, sendo alguns de uso direto e outros indiretos via alimentos industrializados, como é o caso da farinha de soja utilizada em panificação (HE E CHEN, 2013; DAHMER et al., 2018), tofu (SCHMIDT et al., 2017), brotos (CANTELLI et al., 2017), bebida de soja (THEODOROPOULOS et al. 2018) e silagem de soja (VIEIRA et al., 2018).

Dentre os diversos produtos desenvolvidos a partir da soja, destaca-se o tofu, originário da China e cada vez mais popular. O tofu contém alto teor de proteínas (em torno de 8,8 %) e ácidos graxos essenciais, como ácido linoleico, ácido linolênico e ácido araquidônico (BENASSI et al., 2013; GUO et al., 2018). É mais consumido pelas pessoas no leste da Ásia e tem sido amplamente aceito por pessoas de diferentes áreas do mundo (FEI et al., 2017; LEE et al., 2017).

Considerado um alimento saudável, pode ser utilizado como substituto de produtos de origem animal, e apresenta-se como uma fonte importante de proteína quando comparado com carne, peixe e queijo, tornando-se importante para indivíduos veganos (LI et al., 2015). Além do público vegano pode ser consumido por indivíduos que apresentam intolerância à lactose, mas pode ser consumido também pela sociedade no geral que é adepta a uma alimentação saudável. Possui sabor suave e textura porosa, é livre de colesterol, bem como excelente fonte de proteínas, minerais e ácidos graxos poli-insaturados (PAULETTO e FOGAÇA, 2012; SERRAZANETTI et al., 2013).

Produtos à base de soja como o leite de soja, bebidas à base de soja são produzidos adicionando vários ingredientes à base de soja, tais como sabores, gomas, estabilizantes, minerais, vitaminas, açúcares, sucos de frutas (PERFEITO et al. 2017; BORGES et al. 2016). Na formulação de tofu, visando atender ao consumo de indivíduos veganos, pode-se utilizar coagulantes de origem vegetal como opção de coagulação do tofu, como kiwi, limão e gengibre e os efeitos de coagulação podem ser diferentes entre as espécies de vegetais testadas no processamento de tofu, ocasionando diferenças principalmente na textura do produto, a qual pode ser ocasionada pela variação de pH e temperatura de coagulação (SCHMIDT et al., 2017).

Outro coagulante vegetal que pode ser utilizado é a flor do cardo, coagulante de leites, sendo que uma das espécies mais utilizadas é derivada da *Cynara cardunculus* L., porém não descrito na literatura para a coagulação de EHS. Normalmente, este coagulante é utilizado para a obtenção de um queijo de leite de ovelha amanteigado, com características sensoriais diferenciadas devido a sua maior capacidade proteolítica, que favorece a formação de queijos com características inigualáveis e amplamente aceitas pelos consumidores (GARCÍA et al., 2011; FAION et al., 2020).

Tradicionalmente, o tofu consiste em um gel desenvolvido a partir do extrato de soja, que apresenta a primeira etapa como a desnaturação das proteínas pelo calor e de acordo com o método utilizado, tipo de coagulante e o teor de umidade, pode ser denominado como tofu firme, tofu macio e tofu tipo *silken*. Outros parâmetros como o rendimento e a qualidade do produto são influenciados pelo tipo de cultivar de soja, qualidade do grão (que depende das condições de cultivo da planta e do armazenamento) e pelas condições de processamento do tofu (LI et al., 2013).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi desenvolver tofus com extrato hidrossolúvel de cultivares de soja, BRS 267 e Vmax, coagulados com flor do cardo e cloreto de magnésio, caracterizá-los quanto as propriedades físicas, químicas e microbiológicas, análise de perfil de textura, morfologia dos grânulos após a coagulação e características sensoriais pelos testes de aceitação e intenção de compra.

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1 Soja**

Os grãos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) das cultivares BRS 267 e Vmax, oriundas da região de Passo Fundo – RS, foram fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) – Centro Nacional de Pesquisa Trigo.

### **2.2.2 Obtenção do Extrato Hidrossolúvel de Soja (EHS)**

O EHS foi obtido conforme metodologia descrita por Scherer et al. (2021), utilizando para o processo de maceração o tempo de 6 h e temperatura de 45 °C. A partir da obtenção do EHS foi realizada a caracterização do teor de proteínas, atividade antioxidante e determinação de pH.

### **2.2.3 Obtenção do extrato coagulante de flor do cardo**

Para o desenvolvimento do tofu com flor de cardo como coagulante, utilizou-se metodologia modificada de Almeida et al. (2010). As amostras de flor do cardo foram

obtidas de ervaria de Viana do Castelo de Portugal. Para a preparação do coagulante vegetal foi utilizada 3,5 g de flor do cardo e 25 g de sal, os quais foram macerados e esta mistura foi utilizada para 1 L de EHS. Após preparado o coagulante, este foi utilizado na proporção de 2 mL para 2 L de EHS, 30 °C e 60 min. Do extrato da flor do cardo foi realizada a caracterização das frações proteicas, atividade de protease, pH e atividade antioxidante.

#### 2.2.4 Elaboração de formulações de tofu

Os tofus foram elaborados com as duas cultivares (BRS 267 e Vmax) a partir da metodologia adaptada de Benassi et al. (2011) utilizando extrato coagulante flor do cardo e MgCl<sub>2</sub> (formulação padrão). Os tofus foram denominados F1 – cultivar BRS 267 e coagulante flor do cardo, F2 – cultivar Vmax e coagulante flor do cardo, F3 – cultivar BRS 267 e coagulante MgCl<sub>2</sub>, F4 – cultivar Vmax e coagulante MgCl<sub>2</sub>. Inicialmente 2 L do EHS foi tratada termicamente em recipiente coberto, sob fogo direto, até temperatura de 90 °C, seguido de mais 10 min em banho-maria. Após aquecimento, o EHS foi transferido para um recipiente de vidro e deixado arrefecer até a temperatura adequada de coagulação (variável de acordo com o agente coagulante utilizado), para flor do cardo 30 °C e 70 °C para o MgCl<sub>2</sub> (utilizado 5 g diluído em 40 ml de água destilada para 2 L de EHS). Atingida as temperaturas, foram adicionados os agentes coagulantes, nos respectivos EHS, homogeneizado e deixado em repouso para coagular (tempo de coagulação variável conforme coagulante utilizado, sendo 60 min para flor do cardo e 20 min para o cloreto de magnésio).

Após a coagulação, realizou-se o corte da coalhada em movimentos transversais lentos e tamanho de grânulos de 2 cm. A coalhada foi colocada em formas plásticas de aproximadamente 500 mL, perfuradas e forradas com “tunil”, por 30 min. Após retirados da forma, os tofus foram acondicionados em recipientes plásticos fechados, sem adição de água, em geladeira a temperatura de 4 °C e armazenados por 14 dias. Os tofus, obtidos a partir das diferentes formulações, foram caracterizadas quanto a umidade, pH, cinzas, lipídios, proteína bruta, índices de cor (L\*, a\*, b\*, C\*, °Hue e ΔE), inibidor de tripsina Kunitz (ITK), atividade ureática, ácido fítico, sólidos solúveis, acidez, sinérese, análise do perfil textura, análise microbiológica (coliformes a 45 °C, contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e pesquisa de *Salmonella* sp.) durante o 1º, 7º e 14º dias de armazenamento. O rendimento, a fração proteica e a atividade antioxidante foram obtidas durante o primeiro dia da elaboração das diferentes formulações de tofu. A morfologia dos grânulos da estrutura avaliada no início e fim da coagulação de cada formulação de tofu elaborada.

#### 2.2.5 Determinação de rendimento e sinérese

O rendimento do tofu foi calculado de acordo com Benassi et al. (2011), utilizando a Equação 1, que dá ao tofu a proporção em massa corrigida para o volume parcial de EHS utilizado. A massa de cada tofu foi relacionada à massa inicial de grãos e o rendimento foi expresso em termos de g de tofu/100g de grãos. Os resultados foram expressos em base úmida.

(Equação 1)

$$\text{Rendimento dos tofus} = \frac{\text{massa do tofu}}{\text{massa de soja}} + \frac{\text{massa do EHS}}{\text{massa de soja}} \times 100$$

O índice de sinérese foi determinado nos tofus pelo método da drenagem, de acordo com Hassan et al. (1996), para o qual uma determinada quantidade de amostra foi transferida para um funil contendo papel filtro Whatmann quantitativo nº 5. O volume do soro coletado durante 4 h a 4 °C foi quantificado e o índice de sinérese foi calculado de acordo com a Equação 2. O índice de sinérese foi expresso em termos de %, em base úmida.

(Equação 2)

$$\text{Sinérese} = \frac{\text{Massa do soro após filtração}}{\text{Massa da amostra}} \times 100$$

### 2.2.6 Análise microbiológica

As análises microbiológicas dos tofus consistiram na determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 45 °C, contagem de *Staphylococcus coagulase* positiva e pesquisa de *Salmonella* sp., conforme estabelecido pela RDC 331/2019 (BRASIL, 2019b) e IN 60/2019 (BRASIL, 2019a). A contagem de *B. cereus* foi realizada em ágar seletivo para cereus (Acumedia) (SILVA et al., 2007).

Para a determinação de Coliformes a 45 °C, partiu-se da informação de que as bactérias que pertencem as coliformes fecais são capazes de fermentar a lactose produzindo gás a 45 °C. Dentro deste grupo, a *Escherichia coli* é a principal bactéria e para a determinação de coliformes fecais, foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP), seguindo o Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos (SILVA et al. 2001). E a análise realizada em 3 etapas diferentes, que consistiram: na preparação da amostra e diluições seriadas, em teste presuntivo e teste confirmativo de coliformes fecais, descritas abaixo.

*O Preparo da amostra e diluições:* Manteve-se acesa uma lamparina entre uma balança e a amostra, com o intuito de esterilizar o ambiente. Transferido 25 g de cada amostra, utilizando faca e colher esterilizadas, para um frasco erlenmeyer previamente esterilizado contendo 225 mL de água peptonada 0,1 %, e em seguida foi homogeneizado (diluição 10<sup>-1</sup>). Em seguida, transferido 1 mL desta primeira diluição para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1 % e foi homogeneizado (diluição 10<sup>-2</sup>). Então, foi retirado 1 mL deste tubo de ensaio e adicionou-se em outro tubo de ensaio contendo novamente 9 mL de água peptonada 0,1 % e homogeneizou-se (diluição 10<sup>-3</sup>).

*Teste presuntivo:* nesta etapa foram retiradas alíquotas de 1 mL de cada diluição e inoculadas em 3 tubos contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com um tubo de Durham dentro. No total foram utilizados 9 tubos para cada amostra coletada, e em seguida, foram incubados a 35 °C por 24 h. Após esse período observou-se a ocorrência, ou não de gás dentro do tubo de Durham e/ou turvação do meio dentro do tubo. No caso da presença de gás e/ou turvação, deve-se realizar o teste confirmativo para *Escherichia coli*.

*Teste confirmativo:* para a obtenção da confirmação da presença de Coliformes fecais, foi transferido 1 alçada, utilizando a alça de platina, para cada tubo positivo com caldo LST para igual quantidade de tubos contendo caldo EC (*Escherichia coli*). Em seguida, foram incubados à 43 °C por 24 h. A presença de gás no interior dos tubos de Durham e/ou a turvação do meio é considerada reação positiva para contaminação de origem fecal.

A determinação de *Salmonella* foi realizada seguindo metodologia do Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos (SILVA et al. 2001), e seguiu 3 etapas diferentes, sendo elas: Pré-enriquecimento em caldo não seletivo, Enriquecimento em caldo seletivo e Plaqueamento diferencial. Os resultados são classificados como ausência ou presença de *Salmonella*. As etapas estão descritas abaixo.

*Pré-enriquecimento em caldo não seletivo:* inicialmente realizou-se a pesagem da amostra (25 g) que foi acondicionada em um tubo erlenmeyer contendo 225 mL de caldo lactosado e então foram homogeneizados. Em seguida, foram incubados em estufa à 35 °C por 24 h.

*Enriquecimento em caldo seletivo:* nesta fase objetiva-se inibir a multiplicação de outras bactérias e promover o crescimento preferencial de células de *Salmonella* (SILVA et al. 2001). Após decorrido as 24 h, retirou-se o caldo de pré-enriquecimento da estufa e foi transferido 1 mL do caldo para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo Tetrionato (TT) e 1 mL para outro tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo Selenito Cistina (SC), para cada amostra. Então, foram novamente incubados em estufa à 35 °C por 24 h.

*Plaqueamento diferencial:* após o tempo estipulado, foi transferido uma alçada do caldo TT e uma alçada do caldo SC para placas contendo o meio Rambach agar, e foram incubadas invertidas na estufa à 35 °C por 24 h. Após esse tempo, foi observado se houve desenvolvimento de colônias de *Salmonella*. Considera-se positivo a presença de *Salmonella* se houver crescimento de colônias cor de rosa escuro na placa.

Para a determinação de *Staphylococcus aureus* seguiu-se a metodologia descrita por Silva et al. (2001) através do teste presuntivo – Unidade Formadora de Colônia (UFC/g).

*Teste presuntivo:* primeiramente, foi pesado e homogeneizado 25 g das amostras e transferido para um tubo erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada 0,1 % (diluição  $10^{-1}$ ). Depois foi repassado 1 mL dessa primeira diluição para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1 % (diluição  $10^{-2}$ ). Em seguida, foi realizado o plaqueamento em superfície, repassando 0,1 mL de cada diluição ( $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ) para suas respectivas placas de petri previamente esterilizadas em autoclave com o meio Ágar Baird-parker, espalhando cuidadosamente com uma alça de Drigalski. Em seguida, as placas foram incubadas invertidas em estufa à 35 °C por 48 h. Considera-se resultado positivo quando apresentar colônias circulares, pretas, pequenas, lisas, convexas, com bordas perfeitas ou massa de células esbranquiçadas nas bordas.

### 2.2.9 Análise Sensorial

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (URI-Erechim), com registro na Plataforma Brasil sob o número 12952719.3.0000.5351, em cumprimento aos termos da Res. CNS 466/12 (BRASIL, 2013).

A análise sensorial foi realizada por 60 voluntários, não treinados, da comunidade acadêmica da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões-URI, *Campus* Erechim. Todos os voluntários foram convidados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 6.1 - Termo de consentimento livre e esclarecido) (BRASIL, 2013) e a responder a um questionário (Apêndice 6.2 - Ficha de avaliação sensorial dos tofus), para possibilitar a caracterização dos mesmos sobre gênero, grau de escolaridade, faixa etária e se tinham o hábito de consumir tofu, com a finalidade de identificar a familiaridade destes provadores com o tipo de amostra apresentada. Para o cálculo do índice de aceitação (IA) e ou índice de intenção de compra (IC) dos tofus foi adotada a Equação 3.

(Equação 3)

$$\text{IA ou IC (\%)} = \frac{\text{Média de notas}}{\text{Maior nota}}$$

Onde: Média de notas: representa nota média na escala hedônica, obtida para o produto analisado e Maior nota: representa a nota máxima na escala hedônica que o produto recebeu.

Os participantes da pesquisa receberam 4 amostras de tofu todas codificadas com três dígitos aleatórios e servidas utilizando um delineamento de blocos completos balanceados. Juntamente com as amostras, foi servida água e entregue a ficha para avaliação do tofu. As amostras foram servidas em copos descartáveis de 50 mL, contendo 20 g de amostra e em temperatura em torno de 5 °C.

Os julgadores realizaram primeiramente o teste de aceitabilidade dos tofus, para o qual as amostras foram avaliadas utilizando uma escala hedônica estruturada de 9 pontos onde o número 1 corresponde a “desgostei extremamente” e o número 9 a “gostei extremamente” (DUTCOSKY, 2013) e para a intenção de compra foi utilizada a escala de cinco pontos, que variou de certamente compraria (5) a certamente não compraria (1) (SANTOS et al., 2015).

### 2.2.10 Determinações analíticas

#### 2.2.10.1 Atividade proteolítica

A atividade de proteases do coagulante vegetal de flor do cardo foi avaliada através da hidrólise de azocaseína (CHARNEY e TOMARELLI, 1947). A solução com substrato de azocaseína a 0,5 % (m/v) foi preparada em tampão acetato 50 mM, pH 5,00. A 1 mL do substrato adicionou-se 1 mL de extrato da flor do cardo e incubou-se a mistura por 40 min a 32 °C em banho-maria (Marconi®, modelo MA126). Após a reação, adicionou-se 1 mL de ácido tricloroacético (15 % m/v) com o objetivo de precipitar as moléculas de proteína não hidrolisadas pelas proteases. Posteriormente, a amostra foi centrifugada (centrífuga MPW®, modelo 351R), a 1.358,4 g, por 15 min. Após a centrifugação, 2 mL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo ao qual foi adicionado 2 mL de KOH 5 N. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Spectro Vision®, modelo DB-1880S) a  $\lambda = 428$  nm,

com branco com adição de ácido tricloroacético antes do extrato enzimático, com objetivo de precipitar todas as proteínas (inclusive as proteases), impedindo que ocorra a reação. O cálculo da atividade proteolítica foi realizado através da Equação 4.

(Equação 4)

$$\text{Atividade de protease} = \frac{|ABS amostra| - |ABS branco|}{(0,01) \cdot \Delta t \cdot VA} \text{ U/mL}$$

Onde:

ABS amostra = Valor da absorbância lida para a amostra do extrato enzimático;  
ABS branco = Valor da absorbância lida para o branco da análise;  $\Delta t$  = Tempo decorrido da análise (min); VA = Volume de amostra usado (mL).

### 2.2.10.2 Umidade

A umidade das formulações de tofu foi determinada em estufa com recirculação de ar (Fanem, modelo 320-SE), com aproximadamente 3,0 g de amostra a 105 °C por aproximadamente 4 h ou até massa constante de acordo com AOAC (2007).

### 2.2.10.3 Determinação de pH

As medidas do pH para os tofus e extrato coagulante de flor do cardo, foram realizadas na proporção de 1/10 (v/v) em pHmetro (Digimed, modelo DM-22) de acordo com AOAC (2007).

### 2.2.10.4 Resíduo mineral (Cinzas)

Determinou-se o resíduo mineral das amostras de tofus por combustão da matéria orgânica em mufla (Lavoisier, modelo 400C), a 550 °C por aproximadamente 6 h de acordo com IAL (2008). Porém antes da combustão em mufla, as amostras (~5 g) foram pré-carbonizadas em chapa de aquecimento (VELP, modelo RC). Os resultados foram expressos em g/100 g, em base seca.

### 2.2.10.5 Lipídios

A determinação de lipídios, para os tofus, foram realizadas por extração em Soxhlet (Nova Ética®, modelo NT340), utilizando éter de petróleo (Química Moderna® 30-60 °C) como solvente extrator de acordo com IAL (2008). Os resultados foram expressos em g/100 g, em base seca.

### 2.2.10.6 Proteína

O teor de nitrogênio dos tofus foi determinado pelo método de Kjeldahl, utilizando o sistema digestor-destilador (VELP – UDK 126A) de acordo com IAL (2008), com o fator de conversão para o teor de proteína de 6,38 para os tofus. Os resultados foram expressos em g/100 g, em base seca.

### 2.2.10.7 Índices de cor L\*, a\*, b\*, $\Delta E$ , °Hue e \*C

A cor dos tofus foi determinada através de colorímetro (Minolta Chroma Meter, modelo CR-400), no sistema de cor CIELAB, com os três componentes, L\*

(luminosidade ou brilho) cujo valor varia entre zero (preto) e 100 (branco), e as coordenadas de cromaticidade  $a^*$  e  $b^*$  que variam de  $-a^*$  (verde) até  $+a^*$  (vermelho), e de  $-b^*$  (azul) até  $+b^*$  (amarelo) de acordo com Minolta (2006). A verificação do ajuste do equipamento foi conduzida previamente de acordo com as instruções do fabricante ( $y = 93,10$ ,  $x = 0,3158$ ,  $y = 0,3321$ ). As leituras foram realizadas com as amostras dispostas em placa de Petri (6 cm de diâmetro), realizando-se três medidas em três pontos da placa.

O cálculo da tonalidade cromática ( $C^*$ ) foi realizado através dos valores obtidos diretamente do colorímetro (McGuire, 1992), através da Equação 5.

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad \text{(Equação 5)}$$

O cálculo de  $^\circ\text{Hue}$ , que é a cor observada (McGuire (1992), foi calculado através da Equação 6.

$$^\circ\text{Hue} = \arctan(b^*/a^*) \quad \text{(Equação 6)}$$

O cálculo de  $\Delta E$  foi realizado de acordo com os valores de  $L^*$  e  $b^*$  (Equação 7), a  $\Delta E$  é a diferença entre cada parâmetro de cor da amostra padrão (desenvolvida com  $\text{MgCl}_2$ ) e da amostra teste perceptível ao olho humano (BOSI, 2008).

$$\Delta E = [(L - L_0)^2 + (b - b_0)^2]^{1/2} \quad \text{(Equação 7)}$$

### 2.2.10.8 Inibidor de tripsina Kunitz

Para quantificação do inibidor de tripsina Kunitz dos tofus foi utilizada a metodologia desenvolvida por Kakade (1974). A quantificação inibitória foi realizada por meio de ensaio enzimático utilizando-se o benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) (Sigma® - Pureza  $\geq 98\%$ ) como substrato para a tripsina de pâncreas bovino (Sigma), efetuado em triplicata. Alíquotas de 2 mL da solução diluída do extrato das amostras foram pipetados em 4 tubos de ensaio (3 tubos para determinação da atividade no extrato da amostra e 1 tubo para o branco) e 2 mL de água destilada no tubo para determinar o padrão de tripsina. Os tubos foram acondicionados em banho-maria (Marconi®, modelo MA126) à  $37^\circ\text{C}$ , e em seguida adicionado 2 mL da solução de tripsina (0,02 mg/mL de HCl 0,001 N), com exceção do branco, e após 10 min foram adicionados 5 mL de BAPNA 0,4 mg/mL em tampão Trisma pH 8,2 (contendo 2,95 mg/mL de  $\text{CaCl}_2$  dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Neon pureza 99,0-105,0 %), previamente aquecidos a  $37^\circ\text{C}$ , e deixados os tubos em banho-maria por mais 10 min. Ao final desse período adicionou-se em todos os tubos 1 mL de ácido acético (Dinâmica, pureza 99,7 %) a 30 % (v/v) para interromper a reação. E no tubo do branco adicionou-se mais 2 mL da solução de tripsina. Filtrou-se em papel Whatman nº 3 (Jprolab®) e o filtrado foi utilizado para determinação do teor dos inibidores de tripsina em uma absorvância de 410 nm em espectrofotômetro (Spectro Vision®, modelo DB-1880S).

Os resultados foram expressos como mg de inibidor de tripsina Kunitz (ITK) por g de amostra desengordurada, através da Equação 8.

$$\text{Inibidor de Tripsina Kunitz} \left( \text{mg} \frac{\text{ITK}}{\text{g}} \right) = \frac{|\text{abs padrão}| - |\text{abs amostra}|}{38 \times \text{peso da amostra}} \times 2500 \quad (\text{Equação 8})$$

Onde: Abs padrão: absorbância padrão; Abs amostra: absorbância da amostra; ITK: inibidor de tripsina.

### 2.2.10.9 Determinação da atividade ureática

A atividade ureática dos tofus foi determinada através da quantificação de duas porções de exatamente 0,2 g de amostra e transferidas quantitativamente para dois tubos de ensaio (A e B). Foi adicionado volumetricamente 10 mL de solução tampão de fosfato pH 7,00 ao tubo A. Sendo agitado levemente, sem inverter, os tubos foram tampados e colocados em banho-maria termostatizado a 30 °C. Na sequência foram agitados levemente a cada 5 min, até completar 30 min. Após transcorrido esse tempo, foi retirado o tubo do banho e medido o pH do líquido sobrenadante em potenciômetro previamente calibrado. Este resultado corresponde a prova em branco.

Ao tubo B foi adicionado volumetricamente 10 mL de solução tamponada de ureia pH 7, e após procedeu-se da mesma forma que foi realizado no tubo A, anotando o pH da solução sobrenadante resultante. A diferença de pH entre as duas soluções é o índice de atividade ureática, de acordo com metodologia descrita por Brasil (1991). A atividade ureática é calculada pela expressão da Equação 9.

$$\text{Atividade ureática} = \text{pH da amostra B} - \text{pH da amostra A} \quad (\text{Equação 9})$$

### 2.2.10.10 Quantificação do ácido fítico

A determinação de ácido fítico dos tofus foi realizada por cromatografia de troca iônica, segundo metodologia descrita por Latta e Eskin (1980), com modificações. Inicialmente, quantificou-se 1 g de amostra em Erlenmeyer de 125 mL e adicionou-se 10 mL de solução HCl 0,8 M e submeteu-se a agitação em agitador magnético (Velp Scientifica®) durante 2 h. Em seguida foi centrifugado (centrífuga MPW®, modelo 351R), a 2000 rpm durante 10 min para a obtenção do sobrenadante, 2 mL deste foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água ultrapura. Em seguida, foi preparada a coluna em seringa de vidro contendo 1 cm de lã de vidro e 0,50 g de resina (Dowex®, 1x4 chloride form) e empacotou-se a coluna, lavando-se com água ultrapura até que toda a resina ficasse uniforme no fundo da coluna, descartando a água que foi utilizada. Posteriormente, foi eluído 10 mL de NaCl 0,7 M (3 s/gota) e 10 mL de água ultrapura (3 s/gota). Após, foi eluído 2 mL da amostra diluída (5 s/gota), desprezando em béquer. Foi eluído cuidadosamente 10 mL NaCl 0,1 M (3 s/gota), desprezando em béquer. Eluiu-se cuidadosamente 10 mL NaCl 0,7 M (5 s/gota), coletando-se em béquer. Em tubos de ensaio foi subdividido o líquido coletado em 3 alíquotas de 3 mL, adicionou-se 1 mL do reativo de Wade e agitou-se durante 5 s em agitador tipo "vórtex" (Phoenix®, modelo AP 56) e foi realizada a leitura da amostra em espectrofotômetro (Spectro Vision® modelo DB-1880S) a 500 nm. Os resultados foram expressos em % (g/100 g), através da Equação 10:

$$AF(\%) = \frac{(ABS_a - ABS_w) \times Fd}{M \times F \times 10000} \quad (\text{Equação 10})$$

Onde: AF (%) = Porcentagem de ácido fítico; ABS<sub>a</sub> = absorbância amostra; ABS<sub>w</sub> = absorbância Wade; F = fator da curva (diferença ABS/concentração em µg), Fd = fator de diluição e M = massa da amostra, em g.

#### 2.2.10.11 Acidez titulável

A acidez titulável de soja foi determinada em graus Dornic através da titulação com hidróxido de sódio 0,1 N (acidez titulável), seguindo orientações dos métodos 016/IV e 311/IV do IAL (2008).

#### 2.2.10.12 Frações proteicas por eletroforese (SDS-PAGE)

A SDS-PAGE foi conduzida nas diferentes formulações de tofu em seu 1º dia de armazenamento e no extrato de flor do cardo segundo Laemmli (1970) com pequenas modificações, e foi utilizado um gel de poliacrilamida com gradiente de 5-13 g/100 g, pré-moldado em gel de eletroforese Bio-Rad Mini (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). A amostra de proteína (4,0 mg) foi dissolvida em 1,0 mL de tampão, bem misturada e depois aquecida sob fervura durante 1 min. Após centrifugação a 6000 rpm por 10 min, o sobrenadante obtido (8 µL) foi carregado em cada chapa, e marcadores comerciais (Solarbio, Beijing, China) de massa molecular (11-180kDa) foram utilizados. A eletroforese foi realizada com tampão (0,025 mol/L Tris, 0,192 mol/L de glicina, 0,1 g/100 g de SDS, pH 8,3) a 80 V seguido de 110 V quando a linha azul atinge o gel de separação. Finalmente, os géis foram corados com 0,1 g/100 mL de azul Coomassie Brilliant (R-250) por 2 h e descoloridos em solução de metanol/ácido acético/água deionizada (5:10:85, por volume) por 12 h.

#### 2.2.10.13 Atividade antioxidante por DPPH

Para determinação da atividade antioxidante do tofu e do extrato de flor do cardo, as amostras foram primeiramente acondicionadas em papel alumínio e submetidas ao congelamento em ultrafreezer (CL 600-80) a -80 °C por 24 h. Posteriormente, foram liofilizadas (Liotop L101AISI304) por 24 h.

A determinação da atividade antioxidante foi realizada por meio da medida da absorção do radical 2,2 difenil-1-picril hidrazil (DPPH) em 515 nm utilizando espectrofotômetro (UV-Visível marca Agilent Technologies, modelo 8453E), através da incubação por 30 min de 500 µL de soluto contendo concentrações crescentes da amostra (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 5; 7,5; 10 mg/mL) em etanol (Êxodo Científica 96 % de pureza). Para o controle, utilizou-se 500 µL de DPPH (concentração de 0,039 g/L) com 500 µL de etanol. O percentual de captação do radical DPPH foi calculado em termos de porcentagem da atividade antioxidante (AA %) conforme a Equação 11 (MIRANDA; FRAGA, 2006).

$$AA \% = \frac{100 - (Abs \text{ amostra} - Abs \text{ do branco})}{Abs \text{ controle}} \times 100$$

Equação (11)

Onde: Abs é a absorbância dada em nm;

AA: Atividade antioxidante.

Para leitura do branco utilizou-se etanol puro.

Após a avaliação da faixa de concentração ideal, calculou-se a concentração necessária para capturar 50 % do radical livre DPPH (IC<sub>50</sub>) por análise de regressão linear.

#### **2.2.10.14 Análise do Perfil de Textura (APT)**

A APT foi realizada na Universidade Estadual do Santa Catarina - UDESC, unidade de Pinhalzinho, de acordo com Zuo et al. (2016) com adaptações, em texturômetro (CT3, Brookfield), por compressão dupla de amostras cilíndricas contidas em recipientes plásticos de 2,0 cm de altura e 3,5 cm de diâmetro. Os parâmetros empregados nos ensaios foram 0,10 N para carga de trigger, 10 mm de distância de deslocamento e velocidade de teste pré-teste, teste e pós-teste de 1 mm/s, 2 mm/s e 2 mm/s, respectivamente, com probe cilíndrica de acrílico de 25,4 mm de diâmetro. As propriedades de textura obtidas foram dureza (N), coesividade, gomosidade (N) e elasticidade (mm). Todas as amostras foram analisadas em quintuplicata.

#### **2.2.10.15 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Para análise da estrutura de granulos das amostras de tofu obtidas a partir das diferentes formulações, foram coletadas alíquotas no início (após adição dos coagulantes) e no final (após dessoragem) da coagulação e então as amostras foram acondicionadas em papel alumínio e submetidas ao congelamento em ultrafreezer (CL 600-80), a -80 °C por 24 h. Posteriormente, foram liofilizadas (Liotop L101AISI304) por 24 h. As superfícies das amostras foram recobertas com ouro (20 nm) utilizando um metalizador Quorum, SC 7620, UK. A análise morfológica estrutural foi obtida pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando um microscópio (Zeiss, modelo EVO LS25, Alemanha). As micrografias foram obtidas com 200 µm e tensão de 10 kV.

#### **2.2.11 Análise estatística**

Os resultados (N=3) obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a nível de 95 % de confiança, utilizando o software Statistica (versão 5.0 StatSoft, Inc., Tulsa OK, USA).

Para a realização de análise de correlação de Pearson e Análise dos Componentes Principais (ACP) utilizou-se a versão Free do programa XLSTAT 2020.

### **2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **2.3.1 Características físicas e químicas dos tofus**

É possível observar que a umidade das formulações de tofus (Tabela 1), apresentaram valores que variaram na faixa de 80,23 a 86,4 g/100 g, com diferenças significativas entre as amostras, sendo que os tofus desenvolvidos com coagulante flor do cardo (F1 e F2), apresentaram maior capacidade de retenção de água apresentando maior teor de umidade, isso ocorreu possivelmente devido à baixa reticulação entre as

moléculas de proteína resultando em um produto mais macio. Desta forma, os coagulantes utilizados na coagulação da proteína de soja favoreceram a formação de tofu *soft* que apresenta entre 80 % a 97 % de água, proporcionando uma elevada umidade ao produto (CIABOTTI et al., 2009). A baixa reticulação proporciona uma massa macia, deixando solta a organização abrangente, possibilitando muitas lacunas de ar dentro da rede (JAYASENA et al., 2014). Porém, considerando os dias de armazenamento do produto, observa-se que o teor de umidade diminuiu para todos os tofus avaliados. Lee et al. (2019) encontraram resultados similares aos deste trabalho, com valores de 79,34, 81,88 e 82,25 g/100 g de tofu.

Tabela 1: Características físicas e químicas das formulações de tofus elaborados com as cultivares BRS 267 e Vmax coagulados com flor do cardo e cloreto de magnésio durante os dias de armazenamento (1, 7 e 14 dias).

Análises	Dias	Tofus				
		Coagulação com flor do cardo		Coagulação com cloreto de magnésio		
		BRS 267 (F1)	Vmax (F2)	BRS 267 (F3)	Vmax (F4)	
Umidade (g/100 g)	1	86,40 <sup>aA</sup> ±0,10	85,79 <sup>bA</sup> ±0,37	80,23 <sup>dA</sup> ±0,03	80,97 <sup>cA</sup> ±0,15	
	7	85,91 <sup>aB</sup> ±0,03	85,46 <sup>bAB</sup> ±0,16	79,90 <sup>cB</sup> ±0,10	80,13 <sup>cB</sup> ±0,14	
	14	83,37 <sup>aC</sup> ±0,15	83,15 <sup>aB</sup> ±0,05	79,70 <sup>bB</sup> ±0,10	79,92 <sup>bC</sup> ±0,04	
pH	1	5,36 <sup>cA</sup> ±0,03	5,40 <sup>bcA</sup> ±0,02	5,45 <sup>abA</sup> ±0,03	5,49 <sup>aA</sup> ±0,01	
	7	5,29 <sup>bB</sup> ±0,01	5,34 <sup>bAB</sup> ±0,04	5,36 <sup>abB</sup> ±0,03	5,42 <sup>aB</sup> ±0,02	
	14	5,24 <sup>bC</sup> ±0,01	5,29 <sup>bB</sup> ±0,04	5,30 <sup>abC</sup> ±0,01	5,36 <sup>aB</sup> ±0,01	
Cinzas (g/100 g)	1	0,75 <sup>bA</sup> ±0,03	0,76 <sup>bA</sup> ±0,02	0,85 <sup>aA</sup> ±0,02	0,86 <sup>aA</sup> ±0,01	
	7	0,70 <sup>bAB</sup> ±0,03	0,72 <sup>bB</sup> ±0,01	0,81 <sup>aAB</sup> ±0,02	0,83 <sup>aB</sup> ±0,01	
	14	0,69 <sup>bB</sup> ±0,01	0,70 <sup>bB</sup> ±0,01	0,79 <sup>aB</sup> ±0,01	0,79 <sup>aC</sup> ±0,01	
Lipídios (g/100 g)	1	3,93 <sup>bA</sup> ±0,09	4,25 <sup>aA</sup> ±0,02	3,85 <sup>bA</sup> ±0,03	4,15 <sup>aA</sup> ±0,09	
	7	3,85 <sup>bA</sup> ±0,05	4,23 <sup>aAB</sup> ±0,01	3,80 <sup>bAB</sup> ±0,04	4,13 <sup>aA</sup> ±0,06	
	14	3,80 <sup>bcA</sup> ±0,02	4,16 <sup>aB</sup> ±0,04	3,73 <sup>cB</sup> ±0,03	4,10 <sup>abA</sup> ±0,10	
Proteína Bruta (g/100 g)	1	12,45 <sup>aA</sup> ±0,03	12,18 <sup>bA</sup> ±0,01	11,36 <sup>cA</sup> ±0,03	11,26 <sup>dA</sup> ±0,05	
	7	12,15 <sup>aB</sup> ±0,02	11,49 <sup>bB</sup> ±0,01	11,34 <sup>cA</sup> ±0,02	11,20 <sup>dAB</sup> ±0,06	
	14	11,64 <sup>aC</sup> ±0,04	11,25 <sup>bC</sup> ±0,02	11,23 <sup>bB</sup> ±0,01	11,15 <sup>cB</sup> ±0,01	
Cor	L*	1	79,65 <sup>cA</sup> ±0,34	81,58 <sup>aA</sup> ±0,06	78,58 <sup>dA</sup> ±0,16	80,58 <sup>bA</sup> ±0,06
	a*		0,58 <sup>aB</sup> ±0,02	0,35 <sup>bA</sup> ±0,03	0,22 <sup>cB</sup> ±0,04	0,13 <sup>dB</sup> ±0,02
	b*		12,6 <sup>dA</sup> ±0,03	13,78 <sup>bA</sup> ±0,01	12,75 <sup>cA</sup> ±0,09	14,79 <sup>aA</sup> ±0,01
	ΔE		0,61 <sup>bC</sup> ±0,16	1,06 <sup>aA</sup> ±0,12		
	°Hue		1,52 <sup>bA</sup> ±0,01	1,55 <sup>aA</sup> ±0,01	1,55 <sup>aA</sup> ±0,01	1,56 <sup>aA</sup> ±0,01
	C*		12,62 <sup>cA</sup> ±0,30	13,78 <sup>bA</sup> ±0,01	12,75 <sup>cA</sup> ±0,10	14,79 <sup>aA</sup> ±0,01
	L*		7	79,24 <sup>bA</sup> ±0,12	79,83 <sup>aB</sup> ±0,06	77,61 <sup>cB</sup> ±0,02
a*	0,66 <sup>aAB</sup> ±0,05	0,39 <sup>cA</sup> ±0,02		0,16 <sup>bAB</sup> ±0,12	0,10 <sup>bAB</sup> ±0,05	
b*	12,08 <sup>bB</sup> ±0,09	13,48 <sup>aB</sup> ±0,26		12,38 <sup>bA</sup> ±0,16	13,67 <sup>aA</sup> ±0,30	

$\Delta E$		1,38 <sup>aA</sup> ±0,19	0,36 <sup>bA</sup> ±0,02		
°Hue		1,52 <sup>bA</sup> ±0,01	1,54 <sup>abA</sup> ±0,01	1,56 <sup>aA</sup> ±0,01	1,56 <sup>aA</sup> ±0,01
C*		12,10 <sup>cB</sup> ±0,10	13,49 <sup>ab</sup> ±0,26	12,39 <sup>bA</sup> ±0,17	13,67 <sup>ab</sup> ±0,30
L*	14	78,30 <sup>bB</sup> ±0,05	79,37 <sup>aC</sup> ±0,33	77,18 <sup>cC</sup> ±0,04	79,62 <sup>ab</sup> ±0,32
a*		0,72 <sup>aA</sup> ±0,03	0,40 <sup>bA</sup> ±0,04	0,12 <sup>cA</sup> ±0,03	0,06 <sup>dA</sup> ±0,02
b*		11,12 <sup>cC</sup> ±0,09	13,45 <sup>ab</sup> ±0,16	12,14 <sup>bA</sup> ±0,72	12,93 <sup>aA</sup> ±0,40
$\Delta E$		1,28 <sup>ab</sup> ±0,65	0,31 <sup>bB</sup> ±0,26		
°Hue		1,51 <sup>cA</sup> ±0,01	1,54 <sup>bA</sup> ±0,01	1,56 <sup>abA</sup> ±0,01	1,57 <sup>aA</sup> ±0,01
C*		11,14 <sup>dC</sup> ±0,01	13,46 <sup>ab</sup> ±0,16	12,14 <sup>cA</sup> ±0,72	12,93 <sup>bB</sup> ±0,04
Inibidor de Tripsina Kunitz (mg.IT/g)		1	1,23 <sup>aA</sup> ±0,03	1,16 <sup>bcA</sup> ±0,03	1,21 <sup>abA</sup> ±0,02
	7	1,21 <sup>aA</sup> ±0,02	1,13 <sup>bA</sup> ±0,01	1,21 <sup>aA</sup> ±0,01	1,15 <sup>bA</sup> ±0,01
	14	1,20 <sup>aA</sup> ±0,01	1,12 <sup>bA</sup> ±0,01	1,22 <sup>aA</sup> ±0,01	1,14 <sup>bA</sup> ±0,02
Atividade ureática (pH)	1	0,08 <sup>aA</sup> ±0,01	0,06 <sup>aA</sup> ±0,02	0,09 <sup>aA</sup> ±0,01	0,05 <sup>aA</sup> ±0,03
	7	0,07 <sup>aA</sup> ±0,02	0,06 <sup>aA</sup> ±0,02	0,08 <sup>aA</sup> ±0,01	0,05 <sup>aA</sup> ±0,02
	14	0,06 <sup>aA</sup> ±0,01	0,06 <sup>aA</sup> ±0,02	0,08 <sup>aA</sup> ±0,01	0,06 <sup>aA</sup> ±0,02
Ácido fólico (g/100 g)	1	1,81 <sup>aA</sup> ±0,01	1,39 <sup>cA</sup> ±0,04	1,75 <sup>bA</sup> ±0,04	1,37 <sup>cA</sup> ±0,02
	7	1,79 <sup>aB</sup> ±0,01	1,38 <sup>bA</sup> ±0,03	1,74 <sup>aA</sup> ±0,02	1,36 <sup>bA</sup> ±0,02
	14	1,77 <sup>aB</sup> ±0,01	1,38 <sup>bA</sup> ±0,02	1,73 <sup>aA</sup> ±0,01	1,35 <sup>bA</sup> ±0,01
Acidez (% de ácido láctico)	1	0,36 <sup>ab</sup> ±0,04	0,43 <sup>ab</sup> ±0,03	0,32 <sup>bc</sup> ±0,01	0,30 <sup>bc</sup> ±0,02
	7	0,96 <sup>aA</sup> ±0,05	0,94 <sup>aA</sup> ±0,07	0,67 <sup>bB</sup> ±0,02	0,57 <sup>bB</sup> ±0,03
	14	0,98 <sup>cA</sup> ±0,01	1,00 <sup>cA</sup> ±0,03	1,13 <sup>bA</sup> ±0,01	1,25 <sup>aA</sup> ±0,05
Rendimento (g tofu g/100 g grão)	1	216,43 <sup>a</sup> ±3,21	195,35 <sup>b</sup> ±2,08	157,34 <sup>c</sup> ±2,07	162,67 <sup>c</sup> ±0,58
Sinérese (%)	1	24,33 <sup>aA</sup> ±0,6	17,17 <sup>bA</sup> ±1,25	5,5 <sup>cA</sup> ±0,5	6,67 <sup>cA</sup> ±0,76
	7	4,73 <sup>ab</sup> ±0,64	4,53 <sup>ab</sup> ±0,07	1,26 <sup>bB</sup> ±0,05	1,4 <sup>bB</sup> ±0,10
	14	1,89 <sup>aC</sup> ±0,01	1,84 <sup>aC</sup> ±0,06	0,92 <sup>bc</sup> ±0,03	0,88 <sup>bc</sup> ±0,01

\*Média (n=3) ± desvio padrão seguida de letras iguais minúsculas/maiúsculas nas linhas/colunas indicam não haver diferença significativa em nível de 5 % (Teste de Tukey).

Os valores de pH (Tabela 1) não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ) para os tofus desenvolvidos com coagulante natural (F1 e F2) e com cloreto de magnésio (F3 e F4). Cabe ressaltar que o pH do extrato coagulante da flor do cardo foi de 5,13, dos EHS das cultivares BRS 267 e Vmax foram de 6,45 e 6,56, respectivamente. O comportamento levemente ácido do extrato da flor do cardo pode ser um dos fatores que favoreça a coagulação do EHS, e assim pode ter influenciado positivamente a acidez dos tofus das formulações que possuem flor do cardo, com teores que as formulações desenvolvidas com  $MgCl_2$ . Faion et al. (2020) observaram pH ácido para o extrato da flor do cardo (4,5) e obtiveram queijos de leite de ovelha com menor acidez (5,53), mostrando que o extrato da flor proporcionou uma leve acidificação no queijo, pois estes tratamentos apresentaram os maiores valores de acidez. Também se observa que ocorreu uma redução do pH para todas as amostras de tofu com o passar dos dias de armazenamento. Schmidt et al. (2017) encontraram valores de pH próximos aos obtidos

neste trabalho, que foram de 5,2, 5,2 e 4,8, para os tofus desenvolvidos com diferentes coagulantes testados, respectivamente, kiwi, gengibre e limão, utilizando cultivares convencionais de soja, categoria S1. Estes autores também verificaram pequena redução do pH nas amostras armazenadas por 7 dias, quando comparadas com amostras de 1 dia. Fasoyiro (2014) ao desenvolver tofus, utilizou a variedade de soja TGX-1448-IE e coagulante vegetal com diferentes concentrações do cálice de flores secas de Roselle e obteve resultados de pH (5,3 a 6,2) similares aos obtidos neste trabalho.

Os teores de minerais (Tabela 1) demonstrando que o tipo de coagulante influenciou no teor de minerais das amostras de tofu desenvolvidas, pois as amostras coaguladas com flor do cardo obtiveram menores valores, diferindo significativa ( $p < 0,05$ ), dos tofu elaborados com cloreto de magnésio. Pode ser observado ainda que a diminuição do teor de minerais no decorrer do período analisado, para todos os tofus, ou seja, os teores de minerais diminuíram com o passar do tempo, exceto para F1, possivelmente por apresentar maior teor de umidade e maior teor de proteína e possivelmente contribuiu para retenção dos minerais (BENASSI e PRUDENCIO, 2013). Para as demais formulações, de acordo com Schmidt et al. (2017), a redução dos teores de minerais com o passar do tempo de armazenamento ocorre devido a liberação do soro durante o armazenamento, causando migração de sal do tofu para o soro. Resultados similares para os teores de minerais de tofu foram reportados por Kamizake et al. (2016) que obtiveram teores de 0,74 e 0,84 g/100 g para tofu coagulado com  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  produzido com as cultivares Coodetec 214 e BRS 267, respectivamente.

Os valores de lipídios (Tabela 1) encontrados para os tofus desenvolvidos com a cultivar Vmax (F2 e F4) foram significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) aos valores dos tofus da cultivar BRS 267 (F1 e F3), demonstrando que a cultivar influenciou no teor de lipídios conforme publicado anteriormente por Scherer et al (2021), que reportaram 16,10 e 17,63 (BRS 267 e Vmax, respectivamente). Os resultados deste trabalho foram inferiores aos valores reportados por Kamizake et al. (2016) os quais desenvolveram tofus com  $MgSO_4$  e as cultivares de soja Coodetec 214 e BRS 267 e reportaram índices de 5,6 % de lipídios para os dois tofus.

Os valores de proteína bruta (Tabela 1) apresentaram diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ), sendo que os tofus elaborados com o coagulante de flor de cardo apresentaram os maiores valores. Observa-se ainda que durante os períodos de armazenamento 1º, 7º e 14º dia e houve redução no teor de proteínas, possivelmente devido a perda de líquido durante a estocagem e a exudação das proteínas. A redução no teor de proteína durante o armazenamento também foi reportada por Schmidt et al. (2017) e que encontraram valores entre 10,27 a 10,50 g/100 g para a proteína bruta, teores inferiores aos deste trabalho. Kamizake et al. (2016) relataram que para o tofu desenvolvido com soja da cultivar Coodetec 214 e BRS 267 e coagulado com  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , resultados de 6,56 g/100 g e 7,86 g/100 g, respectivamente, sendo menores em relação aos obtidos neste estudo.

Os valores médios de cor (Tabela 1) dos tofus diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) para os parâmetros avaliados, entre as diferentes amostras. Importante ressaltar que o valor de  $L^*$  indica a luminosidade, ou seja, quanto mais próximo de 100, mais clara é a amostra. Assim, observou-se que a amostra F2 foi mais clara ( $p < 0,05$ ),

enquanto que a F3 foi a mais escura, aspectos estes que podem ser melhor observados na Figura 2. Com o passar do tempo de armazenamento de 1º, 7º e 14º dias, observou-se redução da intensidade da luminosidade para todas as amostras de tofu. Kamizake et al. (2016) encontraram valores de  $L^*$  de 86,20 para o Coodetec 214 e 84,82 para a BRS 267 para os tofus coagulados com  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ . Schmidt et al. (2017) relataram valores similares a este trabalho com  $L^*$  85,21, 85,58 e 86,14 para tofus coagulados com kiwi, gengibre e limão, respectivamente. De acordo com Benassi et al. (2012) os tofus podem ser genericamente designados como produtos de cor branca. E segundo Evans et al. (1997) os tofus de cor mais branca podem ser considerados os melhores, pois a cor branca é um fator de qualidade para este produto.

Para o parâmetro  $a^*$  que representa a cromaticidade que varia do verde (-) ao vermelho (+) estes parâmetros foram reduzindo no decorrer do armazenamento para a formulação F3 e F4, aumentaram para a formulação F1 e se manteve sem mudanças para a formulação F2. Apesar das diferenças observadas nos valores do “a”, entre as formulações estes encontram-se na mesma região do espectro de cor com valores menores do que 10, indicando que a cultivar e o coagulante exerceram pouca influência na variação de cor no espectro vermelho ( $a^*$ ), sendo que nessa região tem-se um tom neutro, sem indicação de tendências.

Em relação ao parâmetro  $b^*$  que representa a coordenada de cromaticidade que varia do azul (-) ao amarelo (+), obteve-se valores diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ) para as quatro formulações de tofus avaliadas, sendo a maior intensidade (14,79) obtida para o tofu elaborado com a cultivar Vmax, utilizando cloreto de magnésio como coagulante. Nos demais dias, para um mesmo coagulante, observou-se diferença significativa entre as cultivares, indicando que esta influenciou na cor do tofu, pois BRS 267 e Vmax apresentam valores de  $b^*$  de  $21,00 \pm 0,03$  e  $23,00 \pm 0,37$ , respectivamente, indicando tendência ao amarelo (SCHERER et al. 2021). A qualidade do tofu é expressa por suas características de cor, que variam de branco ao amarelo claro (CIABOTTI et al., 2007). De acordo com essas informações, pode-se perceber que os tofus deste trabalho diminuem quanto a intensidade de cor amarela ( $b^*$ ), especialmente aqueles elaborados com coagulante natural (SCHMIDT et al., 2017). De acordo com Benassi et al. (2012) a cor branca é preferida nos produtos de soja, porém o extrato de soja e o tofu apresentam cor mais amarelos com o passar do tempo. Schmidt et al. (2017) relataram valores similares a este trabalho para o parâmetro  $b^*$  com valores de 15,62, 13,52 e 13,84, quando utilizado coagulantes de kiwi, gengibre e limão, respectivamente.

Sensing (1998) afirma que as diferenças na cor podem ser classificadas com base na variação de cor ( $\Delta E$ ) como:  $< 0,2$  imperceptível;  $0,2$  a  $0,5$  pouco perceptível;  $0,5$  a  $1,5$  pequeno;  $1,5$  a  $3,0$  distinguível;  $3,0$  a  $6,0$  facilmente distinguível;  $6,0$  a  $12$  grande;  $>$  que  $12$  muito grande. Assim, as amostras de tofu apresentaram resultados entre pouco perceptível e pequeno, apesar de variar entre os dias de armazenamento e para os os tofus desenvolvidos com flor do cardo não ocasionaram esta mudança. Observou-se que, de acordo com os valores de  $^\circ\text{Hue}$  (Tabela 1), que os tofus não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando foi utilizado coagulante cloreto de magnésio, independente da cultivar, porém, com a flor do cardo teve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as cultivares, e o  $^\circ\text{Hue}$  apresentou menor resultado para BRS 267.

Quanto ao parâmetro  $C^*$  o maior valor indica maior pureza ou intensidade da cor. As amostras apresentaram diferença entre si ( $p < 0,05$ ) com valores maiores para a formulação F4 e menor para F1 valores que diminuíram com os dias de armazenamento, exceto para F3. Cabe destacar que este parâmetro é considerado o atributo quantitativo de cor, e é usado para determinar o grau de diferença de uma tonalidade em comparação a uma cor cinza com a mesma luminosidade. Assim, quanto mais altos forem os índices de cor  $C^*$ , maior será a intensidade da cor de amostras percebidas por humanos (GRANATO e MASSON, 2010).

Em relação ao inibidor de tripsina Kunitz, por tratar-se de fator antinutricional, torna-se necessário a redução ou inativação desse composto no processamento de alimentos à base de soja (GU et al., 2017). Portanto, observa-se que o processamento térmico empregado para obtenção do extrato hidrossolúvel utilizado na produção do tofu foi capaz de proporcionar a inativação de 93 % do inibidor de tripsina presente na soja (17,96 para BRS 267 e 18,46 para a Vmax) (SCHERER et al. 2021). Ainda, observa-se que os valores do ITK para os tofus foram menores (Tabela 1) do que para os EHS ( $2,10 \pm 0,25$  para BRS 267 e  $2,13 \pm 0,22$  para Vmax, SCHERER et al, 2021), indicando que o processo de transformação dos extratos em tofu contribuiu para obtenção de um produto mais saudável. Ciabotti et al. (2016) ao desenvolverem tofu utilizando o coagulante glucona- $\alpha$ -lactona – GDL e cultivares de soja BRS 133 e BRS 213, obtiveram redução de 79 % da atividade inibidora de tripsina no tofu de soja comum (BRS 133), 81 % no tofu de soja branqueada (BRS 133) e 82 % no tofu de soja livre de lipoxigenase (BRS 213), ou seja, valores inferiores aos do presente trabalho.

Quanto aos valores de atividade ureática (Tabela 1) dos tofus, não foram encontradas diferenças entre amostras ( $p > 0,05$ ), os valores foram reduzidos em mais de 95 % da composição da soja (2,23 para a cultivar BRS 267 e 2,36 para a Vmax) (SCHERER et al. 2021). De acordo com Bausch (2019) a análise de atividade ureática pode ser utilizada como bom indicativo de processo térmico adequado ou inadequado. A metodologia de atividade ureática se fundamenta no princípio de que o tratamento térmico, quando realizado adequadamente, promove a desnaturação da enzima urease presente no grão de soja e, quando desnaturada, pode servir de indicativo da inativação dos inibidores de tripsina.

Os teores de ácido fítico nos tofus diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1), indicando que as cultivares de soja influenciaram na diferença, mas o tipo de coagulante não. Os resultados foram inferiores a 2 %, sendo assim, considerados alimentos com ação funcional, pois de acordo com Kumar et al. (2005), concentração acima de 10 %, ou seja, concentração alta, torna este componente capaz de atuar como substância antinutricional e em concentrações mais baixas apresenta ação funcional.

Os valores de acidez dos tofus no primeiro dia de armazenamento não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as amostras que foi utilizado mesmo coagulante e diferentes cultivares, exceto no último dia de armazenamento (14º dia) para as amostras com  $MgCl_2$ , mas BRS 267 coagulada com flor (F1) não diferiu das amostras com  $MgCl_2$ , somente Vmax com flor do cardo (F2) diferiu das amostras com  $MgCl_2$  e aquelas desenvolvidas com coagulante flor do cardo apresentaram valores superiores inicialmente, porém com o passar dos dias de armazenamento ocorreu um

aumento da acidez e os tofus desenvolvidos com cloreto de magnésio apresentaram maiores valores ao fim do período de armazenamento (Tabela 1). A acidez da flor do cardo foi de 0,45 % de ácido láctico e de acordo com Scherer et al. (2021), a acidez do EHS foi de 1,24 % de ácido láctico para a cultivar BRS 267 e 1,32 % de ácido láctico para a Vmax assim podemos perceber que a acidez do EHS foi maior quando comparada com as formulações de tofu, isto pode ter ocorrido porque a propriedade de coagulação do extrato da flor do cardo e do  $MgCl_2$  é de natureza ácida. Outro fator que pode ter contribuído para a diminuição da acidez nos tofus desenvolvidos com a flor do cardo, pode ser o teor de pH do extrato coagulante da flor do cardo que foi de 5,13, menor que o pH do EHS que foi de 6,45 para a cultivar BRS 267 e 6,56 para a Vmax (SCHERER et al., 2021). Foram relatados por Schmidt et al. (2017) acidez entre 0,06 e 0,17 % de ácido láctico, para os diferentes coagulantes testados (gengibre, limão e kiwi) utilizando cultivares convencionais de soja, categoria S1, valores abaixo dos reportados por este trabalho. Valores similares foram reportados também por Fasoyiro (2014), ao analisar tofus produzidos com soja da variedade TGX-1448-IE (coagulados com diferentes concentrações do cálice de flores secas de Roselle), que encontrou valores variando de 0,16 % a 0,42 % de ácido láctico.

Em relação ao índice de sinérese (Tabela 1) observa-se que os valores foram maiores nos tofus elaborados com o coagulante de flor do cardo, diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) no 1º dia de armazenamento dos tofus elaborados com cloreto de magnésio. No entanto, todas as amostras apresentaram perda de líquido durante o armazenamento, apresentando diferença significativa. Os tofus com flor do cardo apresentaram maior liberação de soro do que os tofus desenvolvidos com cloreto de magnésio tanto no 1º dia de armazenamento, quanto durante os demais dias de armazenamento. Isto pode ter ocorrido devido a atividade de protease presente no extrato da flor do cardo (1,12) a qual provoca ligações de rede fracas entre o coagulante e o EHS. De acordo com Barracosa et al. (2018), a variabilidade entre as populações de cardo pode explicar o perfil enzimático e o poder de coagulação. Além disso, outros autores ressaltam que em Portugal as flores utilizadas para a produção de queijos variam de acordo com o fabricante, pois alguns utilizam flores de plantações próprias e outros adquirem de fornecedores ou em feiras regionais, o que dificulta a padronização. Resultado similar para sinérese foi reportado Schmidt et al. (2017) ao realizar a coagulação de tofu utilizando limão, kiwi e gengibre, sendo que os tofus de kiwi e gengibre apresentaram consistência aquosa e não liberaram totalmente o soro e, assim, apresentaram maior sinérese no 1º dia de armazenamento, os índices de sinérese reportados pelo autor ficaram na faixa de 7,86 e 44,33 %.

Yusef (2004) cita que a protease da flor do cardo é adequada para a fabricação de queijo cottage ou queijo macio, que são produzidos com leite de vaca. De maneira geral, a atividade das cardosinas obtidas da *Cynara cardunculus* apresentam atividade em pH que varia entre 2 e 7, estando a atividade máxima em pH próximo a 5, utilizando-se a caseína como substrato. Porém, em condições de pH alcalino, as cardosinas podem apresentar elevada instabilidade (SOARES, 2008).

Durante a elaboração dos tofus, foi possível observar que os tofus coagulados com o coagulante natural flor do cardo apresentaram maior rendimento, possivelmente por não

ter ocorrido liberação do soro, sendo que estes ficaram com aparência aquosa, ou seja, não apresentaram completa dessoragem, o que contribuiu para um maior rendimento (Tabela 1), porém o maior rendimento pode ter ocorrido também, devido a quantidade e ação do próprio coagulante. Os tofus desenvolvidos com coagulante químico cloreto de magnésio, apresentaram aspecto firme, confirmado pela APT (Tabela 2). O rendimento dos tofus deste trabalho apresentaram resultados abaixo dos relatados por Góes-Favoni et al. (2019) que encontraram valores médios de 241,4 g/100 g de grãos para a soja comercial coagulada com sulfato de magnésio e enzima transglutaminase microbiana (MTGase) como agente de geleificação para obtenção de tofu. No entanto, rendimento menor que o encontrado neste trabalho foi relatado por Fasoyiro (2014) que obteve 83,2 e 94,2 g/100 g de grãos ao utilizar a variedade TGX-1448-IE e diferentes concentrações de coagulantes de extrato de roselle (*Calotropis procera*). Assim, pode-se perceber que o rendimento depende de muitos fatores, como as cultivares de soja utilizadas e métodos de obtenção do extrato de soja, além de parâmetros como temperatura e velocidade de aquecimento, tipo e quantidade do coagulante e, ainda, os equipamentos utilizados no processo de produção (BENASSI et al., 2011). De acordo com Liu et al. (2013) e Yang e James (2013) o rendimento dos tofus pode estar relacionado com a qualidade da soja, que é dependente do local de crescimento, armazenamento e das condições de processamento.

### 2.3.2 Frações proteicas

O extrato da flor do cardo e as formulações de tofu foram caracterizados em relação ao perfil das frações proteicas (SDS-PAGE) de acordo com a Figura 1.

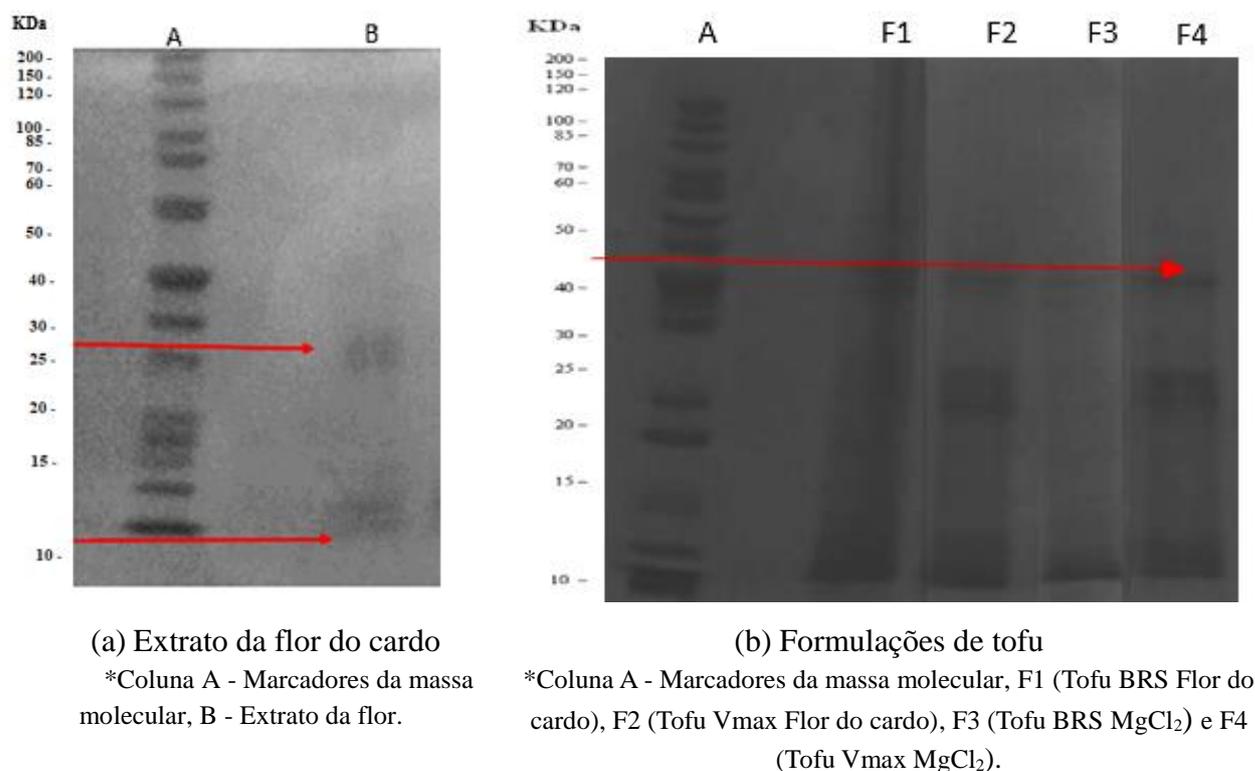


Figura 1: SDS-PAGE de proteínas solúveis presentes em sobrenadantes obtidos a partir de dispersões de amostras de extrato de flor do cardo (a) e dos tofus

desenvolvidos com cultivares de soja BRS 267 e Vmax e coagulantes flor do cardo e  $MgCl_2$  (b).

A partir do gel de SDS-PAGE para o extrato da flor do cardo foram obtidas bandas entre 10 e 60 kDa (Figura 1a). Com proporção maior entre 10 e 25 kDa e pode-se visualizar maior prevalência nas bandas 10 e 24 kDa. Silva et al. (2002) ao realizarem eletroforetograma de extrato de flor do cardo purificado observaram precipitados qualitativamente semelhantes entre si e em todas as frações, com massas moleculares de 31 e 15, e 34 e 14 kDa e bandas com características moleculares 20 a 26 kDa.

Já para os tofus desenvolvidos neste estudo (Figura 1b) foram obtidas bandas em torno de 10 a 45 kDa. Ciabotti et al. (2016) avaliaram os perfis de genótipos de soja e a fração de albumina mostrou uma grande variedade de proteínas, em particular com massas moleculares na faixa de 25 a 100 kDa, com bandas de maior concentração na faixa de 35 e 55 kDa. As globulinas apareceram na faixa de 45 kDa, conforme a Figura 1b, mas as condições de desnaturação podem vir a gerar subunidades na faixa de 20 a 35 kDa, como descrito por Sadeghi et al. (2006), o que pode ter ocorrido no presente trabalho.

Ao comparar os dados do EHS do gel de SDS-PAGE (SCHERER et al., 2021) com os resultados do tofu podemos perceber que ocorreram frações proteicas com bandas entre 10 e 60 kDa para o EHS e que frações mais intensas no tofu são de 10 a 45 kDa. Com proporção maior entre 10 e 25 kDa e em 30, 40 e 50 kDa para o EHS da Vmax e no tofu 10 a 12, 20 a 25, e em 45 kDa. No EHS da BRS 267 visualiza-se maior prevalência entre as bandas 10 e 15 kDa e entre 40 e 50 kDa e os tofus as faixas 10 a 12 e 45 kDa.

### **2.3.3 Características visuais, morfológicas e de textura dos tofus**

A diferença no aspecto visual dos tofus pode ser explicada pelos diferentes coagulantes utilizados, pois a flor do cardo proporciona queijos macios (Figura 2 a e b), e sua coagulação deve-se ao fato da flor possuir um conjunto de enzimas, nomeadamente proteases aspárticas, que influenciam o sabor e textura característicos destes queijos (FOLGADO E ABRANCHES, 2019). Já o  $MgCl_2$ , que é um sal, proporciona queijos mais duros (Figura 2 c e d) produzido pela coagulação do leite de soja (CHUA et al., 2018), resultado este confirmado pela APT de acordo com Tabela 2.

A Figura 2 apresenta o aspecto visual dos tofus desenvolvidos com as cultivares BRS 267 e Vmax coagulados com flor do cardo e cloreto de magnésio.

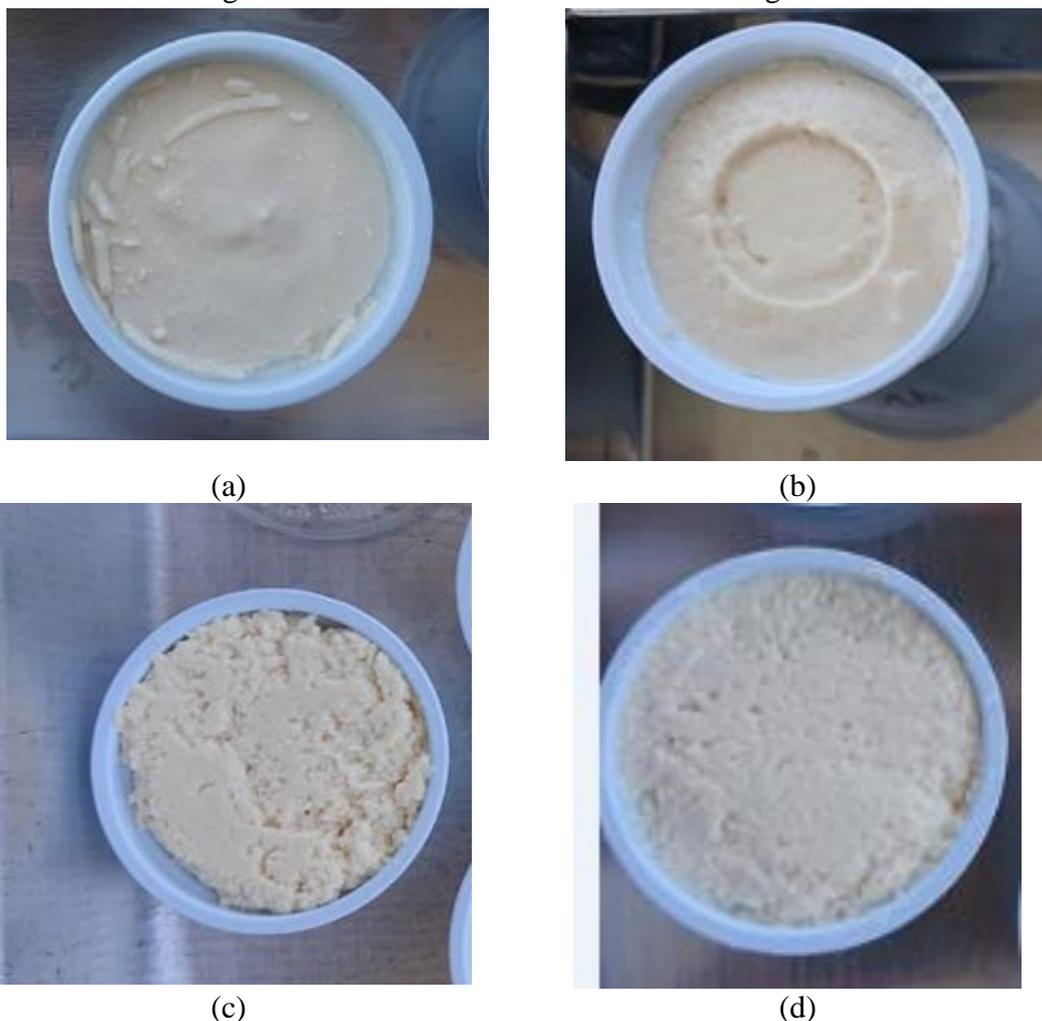


Figura 2: Aspecto visual dos tofus desenvolvidos, F1 (a) – Tofu, Flor do cardo, BRS 267; F2 (b) – Tofu, Flor do cardo, Vmax; F3 (c) – Tofu, Cloreto de magnésio, BRS 267; F4 (d) – Tofu, Cloreto de magnésio, Vmax.

Na Figura 3 apresentam-se as micrografias eletrônicas das formulações de tofu coagulados com flor do cardo no início do processo de coagulação F1 (a) e F2 (b) e após coagulação completa F1 (c) e F2 (d). Já na Figura 4 são apresentadas as morfologias dos tofus coagulados com cloreto de magnésio no início do processo de coagulação F3 (a) e F4 (b) e após coagulação completa F3 (c) e F4 (d).

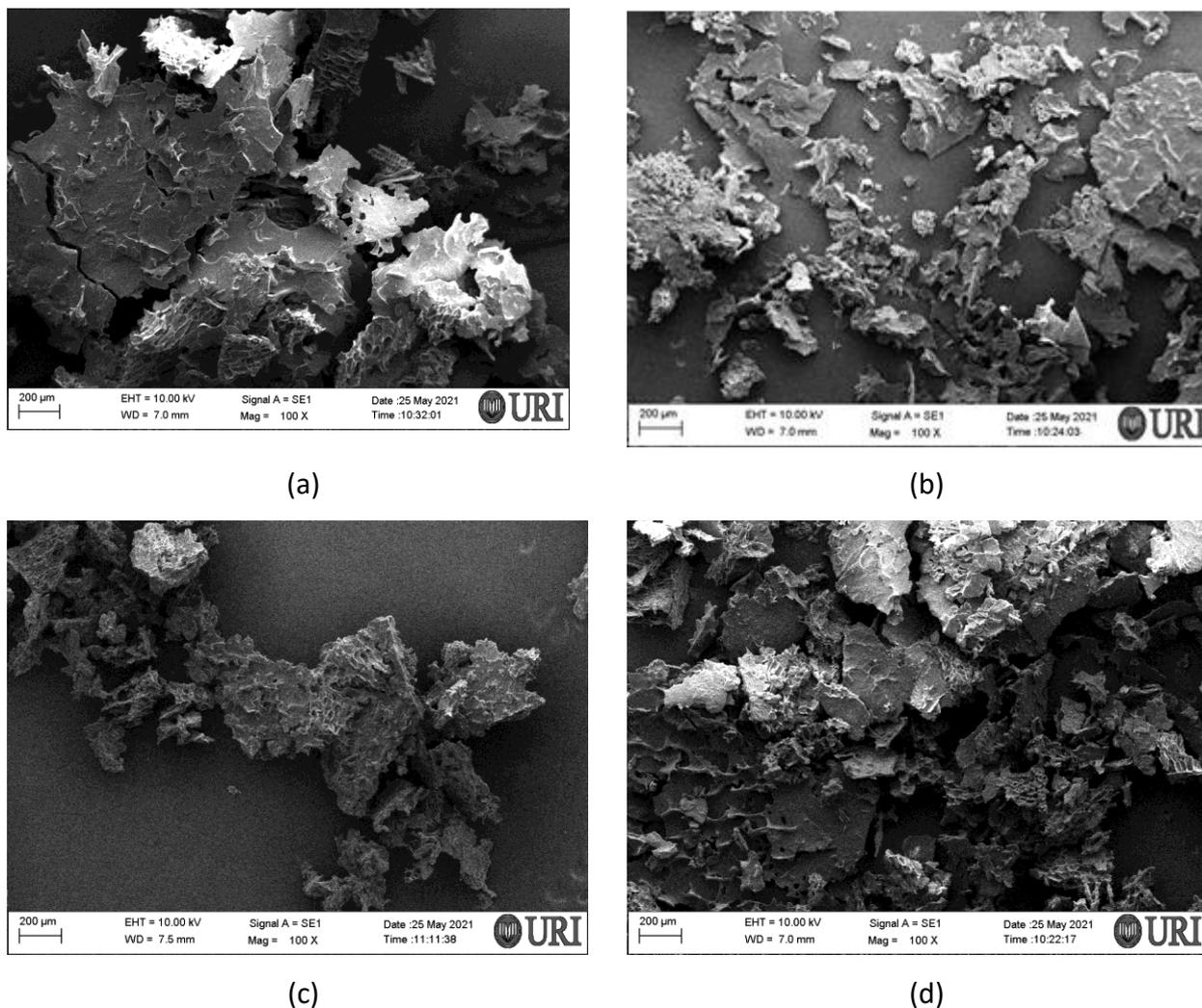


Figura 3: Micrografias eletrônicas das formulações de tofu coagulados com flor do cardo no início do processo de coagulação F1 (a) e F2 (b) e após coagulação completa F1 (c) e F2 (d).

Nas Figuras 3 e 4, considerando as quatro formulações (F1, F2, F3 e F4), observa-se que no início do processo de coagulação as partículas apresentavam-se dispersas, e após a coagulação são verificados agregados de partículas, demonstrando que após a coagulação existe a formação de redes que formam o coágulo. Comparando as microestruturas do tofu coagulado com flor do cardo em relação ao coagulado com  $MgCl_2$ , verifica-se que o primeiro apresenta superfície com aglomerados mais dispersos, o que corrobora com as características visuais do produto, pois este tofu apresenta um coágulo mais uniforme.

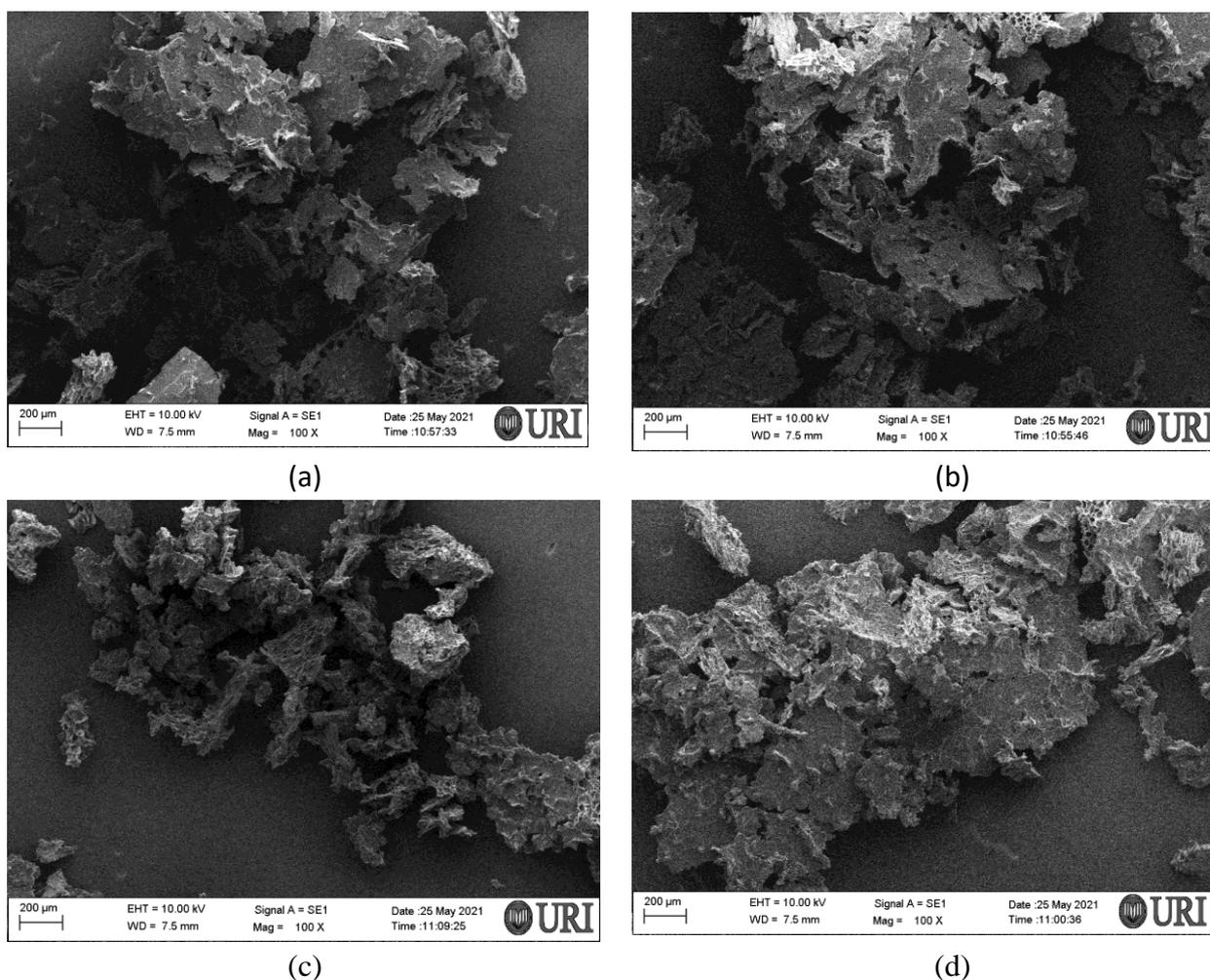


Figura 4: Micrografias eletrônicas das formulações de tofu coagulados com cloreto de magnésio no início do processo de coagulação F3 (a) e F4 (b) e após coagulação completa F3 (c) e F4 (d).

As alterações na microestrutura de tofu estão descritas por diferentes autores e podem estar relacionadas com o tipo de coagulante utilizado, com sua concentração e até mesmo com as condições de coagulação (KAO et al., 2003; PRABHAKARAN et al., 2006). Os tofus obtidos com uso de flor do cardo apresentaram certa descontinuidade na estrutura da matriz proteica com alguns fragmentos e largos poros ou cavidades, os quais possivelmente foram formados pela alta capacidade de retenção de umidade, o que corrobora com os resultados de umidade obtidos para estes tofus (Tabela 1). Esta característica também está relacionada ao rendimento e ao perfil de textura (Tabela 2).

Quanto a análise do perfil de textura (APT) instrumental dos tofus, pode-se perceber considerável variabilidade dos resultados (Tabela 2), uma vez que o tofu que apresentou maior dureza foi o F3 (10,90 N), seguido pelo F4 (6,64 N) e F2 (0,89 N), sendo que o tofu F1 (0,57 N) foi considerado o menos duro. Pode-se inferir que os tofus F3 e F4 apresentaram maior dureza devido ao tipo de coagulante utilizado, pois este ( $MgCl_2$ ) tende a proporcionar queijos mais duros. Meng et al. (2016) prepararam

diferentes tofus com soja selecionada com diferente germoplasma para produção de tofu usando  $MgCl_2$  e obtiveram dureza de 3,64 a 8,66 N. Benassi et al. (2012) ao utilizarem coagulante sulfato de cálcio diidratado ( $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ ), na elaboração de tofus utilizando diferentes cultivares, verificaram que o tofu com a maior dureza (3,8 N) foi o que utilizou a cultivar BRS 216, enquanto os tofus elaborados com as cultivares BRS 262 e 267 foram os menos duros (cerca de 2,3 N). Góes-favoni et al. (2019) utilizaram coagulação com  $MgSO_4$  e soja comercial e obtiveram tofu com dureza de 13,60 N e após 5 dias de estocagem com 18,18 N. A variação da dureza está relacionada a cultivar de soja utilizada na obtenção do produto, ao método de obtenção utilizado, tipo e concentração do coagulante (GÓES-FAVONI et al., 2016; BENASSI et al., 2012; YASIR et al., 2007). Foi possível verificar ainda, que todos os tofus apresentaram tendência de aumento da dureza durante os dias de armazenamento (1°, 7° e 14° dias) (Tabela 2), e este aumento da dureza pode estar relacionado à diminuição da umidade ocorrida no mesmo período (Tabela 1) (GÓES-FAVONI et al., 2016).

Tabela 2: Perfil de textura (dureza, gomosidade, elasticidade coesividade) de tofus desenvolvidos com as cultivares de soja BRS 267 e Vmax (F1, F2, F3 e F4) no 1, 7 e 14° dias de armazenamento.

Textura	Tempo de armazenamento	Amostras de tofu			
		Coagulação com flor do cardo		Coagulação com cloreto de magnésio	
		BRS 267 (F1)	Vmax (F2)	BRS267 (F3)	Vmax (F4)
Dureza (N)	1	0,57 <sup>cC</sup> ±0,06	0,89 <sup>cB</sup> ±0,09	10,90 <sup>aC</sup> ±0,05	6,64 <sup>bB</sup> ±0,17
	7	0,68 <sup>dB</sup> ±0,01	1,15 <sup>cA</sup> ±0,01	11,45 <sup>aB</sup> ±0,07	7,68 <sup>bA</sup> ±0,08
	14	0,86 <sup>dA</sup> ±0,02	1,20 <sup>cA</sup> ±0,12	12,19 <sup>aA</sup> ±0,01	7,91 <sup>bA</sup> ±0,15
Gomosidade (N)	1	0,38 <sup>cB</sup> ±0,04	0,39 <sup>cA</sup> ±0,05	3,79 <sup>aB</sup> ±0,07	3,31 <sup>bB</sup> ±0,07
	7	0,41 <sup>cB</sup> ±0,03	0,42 <sup>cA</sup> ±0,02	3,88 <sup>aB</sup> ±0,08	3,44 <sup>bAB</sup> ±0,05
	14	0,51 <sup>cA</sup> ±0,04	0,46 <sup>cA</sup> ±0,06	4,12 <sup>aA</sup> ±0,07	3,47 <sup>bA</sup> ±0,09
Elasticidade (mm)	1	8,17 <sup>bA</sup> ±0,09	7,55 <sup>cA</sup> ±0,07	8,82 <sup>aA</sup> ±0,09	7,97 <sup>bA</sup> ±0,05
	7	7,81 <sup>bB</sup> ±0,05	7,19 <sup>bB</sup> ±0,05	8,66 <sup>aAB</sup> ±0,07	7,65 <sup>bB</sup> ±0,05
	14	7,77 <sup>bB</sup> ±0,06	6,31 <sup>dC</sup> ±0,04	8,56 <sup>aB</sup> ±0,06	7,36 <sup>cC</sup> ±0,07
Coesividade	1	0,56 <sup>aA</sup> ±0,08	0,52 <sup>bA</sup> ±0,04	0,57 <sup>aA</sup> ±0,02	0,63 <sup>aA</sup> ±0,01
	7	0,54 <sup>abAB</sup> ±0,01	0,50 <sup>bA</sup> ±0,01	0,55 <sup>abA</sup> ±0,01	0,59 <sup>aA</sup> ±0,04
	14	0,48 <sup>bB</sup> ±0,04	0,44 <sup>bB</sup> ±0,03	0,51 <sup>abB</sup> ±0,01	0,57 <sup>abB</sup> ±0,05

\*Médias ±desvio padrão seguidas de letras minúsculas/maiúsculas não diferem estatisticamente entre si ( $p \leq 0,05$ ) na linha/coluna, respectivamente.

Quanto aos valores encontrados para a gomosidade, observa-se que os tofus F1, F2, F3 e F4, no 1° dia avaliado indicando que o tipo de coagulante influenciou na gomosidade das amostras, sendo que os tofus desenvolvidos com flor do cardo, utilizando as duas cultivares de soja BRS 267 e Vmax (F1 e F2), não apresentaram diferença significativa entre si ( $p > 0,05$ ) apresentaram valores baixos para gomosidade. Já os tofus desenvolvidos utilizando as duas cultivares de soja BRS 267 e Vmax e

coagulante  $MgCl_2$  (F3 e F4) apresentaram diferença entre si ( $p < 0,05$ ), porém com valores mais altos para a gomosidade. As formulações de tofus elaborados apresentaram comportamento similar nos diferentes dias de armazenamento avaliados.

De acordo com Yuan e Chang (2007) a gomosidade pode ser definida como o produto da dureza e coesividade, que se refere à energia necessária para desintegrar alimentos semi-sólidos antes de serem engolidos. Dessa forma, os tofus desenvolvidos com coagulante cloreto de magnésio (F3 e F4) requerem maior energia na mastigação, pois apresentaram-se mais íntegros e mais resistentes ao rompimento. Benassi et al. (2012) ao desenvolverem tofus com diferentes cultivares de soja encontraram valores de gomosidade de 1,48 a 2,43 (N), valores menores do que no presente trabalho.

A elasticidade dos tofus apresentou diferença estatística entre si ( $p < 0,05$ ), com valores que variaram na faixa de 6,31 a 8,82 mm. Resultados diferentes e com valores inferiores aos observados neste trabalho são reportados por Benassi et al. (2012), que desenvolveram tofu com oito variedades de soja, utilizando sulfato de cálcio diidratado como agente coagulante e encontraram resultados que variaram de 0,89 a 0,90 mm, sem a aplicação da prensagem. Valores menores para a elasticidade em tofus também são descritos por Li et al. (2014), sendo que os resultados variaram de 0,67 a 0,78 mm, incluindo o tofu padrão. Quando a elasticidade é analisada em termos de compressão da APT, ela representa a percepção do gel borrachoso na boca, se apresentar altos valores o gel é quebrado em poucos pedaços grandes, e valores baixos advém da quebra em muitos e pequenos pedaços (DANIELS et al., 2015).

Os resultados para a coesividade das amostras de tofu foram bastante próximos, apresentando resultados entre 0,52 a 0,63 no 1º dia avaliado. Com a estocagem os valores diminuíram e permaneceram entre 0,44 e 0,57 (14º dia). Benassi et al. (2012) também reportaram pequena diferença (0,63 a 0,66) entre as amostras quanto a coesividade. A coesão é definida como o trabalho necessário para superar a ligação intrínseca do material (YUAN e CHANG, 2007). Os quatro tofus desenvolvidos foram quebradiços em pedaços maiores demonstrado pelos valores de coesividade, pois estes são baixos e representam pouca coesividade.

### 2.3.4 Avaliação microbiológica dos tofus

As análises microbiológicas dos tofus (F1, F2, F3 e F4) apresentaram resultados satisfatórios, dentro dos padrões exigidos pela legislação vigente, Instrução Normativa a IN nº 60, de 23 de dezembro de 2019 (BRASIL, 2019) até o 14º dia de armazenamento refrigerado, indicando que os produtos apresentaram-se seguros ao consumo humano. Os resultados dos coliformes a 45 °C apresentaram presença, porém, abaixo do limite máximo estabelecido, *Staphylococcus* coagulase e *B. cereus* não apresentaram contagem, bem como para *Salmonella* sp. que atende a legislação quanto a ausência (Tabela 3). De acordo com Benassi et al. (2007) o tofu deve ser consumido fresco em até cinco dias e o armazenamento deve ser sob temperatura de refrigeração próximo a 5 °C. De maneira geral, pode-se considerar o tofu, um queijo com alto teor de água que, juntamente com seu alto teor de proteínas, o torna suscetível ao crescimento de microrganismos, principalmente se os procedimentos adequados de fabricação e / ou armazenamento não forem seguidos (PAULETTO e FOGAÇA, 2012). Em estudo

realizado para avaliar a qualidade bacteriológica de duas marcas de diferentes tofu industrializados comercializados em um supermercado durante um período de seis meses em 2015, na cidade de Porto Alegre, Brasil. Foram avaliados coliformes, bactérias mesófilas, Staphylococcus coagulase positivo e negativo, Bacillus cereus e Listeria sp. As duas marcas apresentaram sérios problemas sanitários, pois a maioria dos lotes da marca A e todos os lotes da marca B apresentaram-se impróprios para o consumo mesmo na ausência dos outros patógenos pesquisados (RIBEIRO et al., 2017). Assim podemos concluir que todo cuidado quanto ao manuseio e processo de desenvolvimento de tofu devem ser tomados para garantir a segurança dos consumidores.

Tabela 3: Resultados das análises microbiológicas realizadas nas quatro formulações de tofu.

Parâmetros microbiológicos	Dias	Amostras de tofu				IN n° 60, 2019
		Coagulante flor do cardo		Coagulante Cloreto de Magnésio		
		BRS 267 (F1)	Vmax (F2)	BRS 267 (F3)	Vmax (F4)	
Coliformes a 45 °C (NMP/g)	1	<1x10	0	<1x10	0	<1x10 <sup>2</sup>
	7	<5,0x10	0	<1,2x10 <sup>1</sup>	0	
	14	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,5x10 <sup>1</sup>	<1,5x10 <sup>1</sup>	<1,2x10 <sup>1</sup>	
Staphylococcus coagulase positiva (UFC/g)	1	0	0	0	0	<1x10 <sup>3</sup>
	7	0	0	0	0	
	14	0	0	0	0	
Salmonella sp. (25 g)	1	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
	7	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	
	14	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	
B. cereus. UFC/g	1	0	0	0	0	<1x10 <sup>3</sup>
	7	0	0	0	0	
	14	0	0	0	0	

\*NMP/g: número mais provável por grama, UFC/g: unidade formadora de colônia por grama.

### 2.3.5 Análise sensorial dos tofus

A avaliação da intenção de compra e da aceitação sensorial das amostras de tofu (F1, F2, F3 e F4) foi realizada por 60 julgadores não treinados, cujo perfil pode ser observado no Apêndice 6.3. A maioria dos avaliadores pertenciam ao sexo feminino (77 %) e 23 % do sexo masculino, principalmente jovens, na faixa etária de 21 a 30 anos (35 %), seguido pelas faixas etária de 31 a 40 anos (22 %), 18 a 20 anos (17 %) e 41 a 50 anos (15 %) e > 50 anos (12 %). Em relação ao índice de escolaridade, 55 % dos provadores possuíam graduação incompleta, 25 % com pós-graduação e 2 % com ensino médio completo ou incompleto. Quando questionados sobre o consumo de tofu, 80 % dos provadores informaram que nunca haviam consumido este produto, e apenas 20 % já havia provado. Dos avaliadores que já haviam provado tofu, apenas 2 % tinham o hábito de consumir o produto pelo menos uma vez por mês, enquanto os demais (98 %) não possuíam o hábito de consumir tofu com frequência. Benassi et al. (2011),

estudando o consumo de produtos oriundos da soja, verificaram resultados diferentes ao encontrado neste estudo, pois verificaram em sua pesquisa que dentre os alimentos de soja que os julgadores informaram que já consumiram ou consomem, o tofu foi indicado por 42 % do total de julgadores.

De acordo com os resultados obtidos através da análise sensorial, a aceitação global dos tofus apresentou resultados superiores para os tofus coagulados com flor do cardo para as cultivares Vmax (F2) e BRS 267 (F1) de 6,00, e 5,52, respectivamente, correspondendo na escala hêdonica (ABNT, 1998) ao - “Gostei ligeiramente” e ao - intervalo “Não gostei/nem desgostei”, respectivamente. Cabe salientar que as amostras comerciais são elaboradas com coagulantes químicos e um destes coagulantes é o  $MgCl_2$ , o qual foi utilizado neste trabalho, assim pode-se inferir que os resultados dos tofus desenvolvidos com flor do cardo são promissores por apresentarem resultados acima dos tofus com coagulante comercial.

De acordo com a Tabela 4, os tofus elaborados com o coagulante de flor do cardo não apresentaram diferença significativa entre si ( $p > 0,05$ ) quando comparados as diferentes cultivares de soja utilizada, indicando que o tipo de cultivar utilizada não influenciou na aceitação sensorial dos tofus. Ao comparar a aceitação dos tofus elaborados com o coagulante cloreto de magnésio, também não foi verificada diferença significativa entre as duas amostras elaboradas com as diferentes cultivares de soja, as quais apresentaram valor médio de 4,79, correspondendo na escala hêdonica (ABNT, 1998) ao intervalo “Não gostei/nem desgostei” a “Desgostei ligeiramente”. Benassi et al. (2011) encontraram valores médios de 5,8 de aceitação global de tofu, valores similares ao encontrado neste estudo para tofus elaborados utilizando o coagulante de flor do cardo, os quais apresentaram um valor médio de 5,76 na escala hêdonica. Os autores salientaram que os consumidores que participaram do teste sensorial foram escolhidos aleatoriamente e não precisavam ter o hábito de consumir tofu com frequência, aspecto este que pode ter ocasionado a obtenção de resultados próximos da indiferença (nota 5) para as amostras de tofu. Corroborando o que ocorreu neste trabalho, pois para participar do teste sensorial, não era necessário ser consumidor de tofu e de acordo com a pesquisa de perfil (Apêndice 6.4), 80 % dos participantes nunca haviam consumido tofu, e este produto apresenta característica única e nem sempre agrada paladares não habituados ao consumo de alimentos a base de soja como o tofu. Além disso, segundo Furnols et al. (2009), a frequência e a forma de consumo dos produtos influenciam diretamente em sua aceitação sensorial.

Os tofus formulados apresentaram índice de aceitabilidade (IA) acima de 50 %, porém de acordo com Dutcosky (2013) produtos com IA igual ou superior a 70 % são considerados como aceitos. Considerando esta informação, observa-se que o tofu da formulação F2 foi o que chegou mais próximo ao valor proposto pelo autor, pois apresentou um IA de 67 %, indicando que está próximo ao recomendando como produto aceito pelos consumidores (Apêndice 6.2).

Tabela 4: Valores médios do teste de aceitação e intenção de compra para as diferentes formulações de tofu.

Tofu		Aceitação <sup>1</sup>	Intenção de Compra <sup>2</sup>
Coagulação com flor do cardo	BRS 267 (F1)	5,52 <sup>ab</sup> ± 2,45	2,95 <sup>ab</sup> ± 1,36
	Vmax (F2)	6,00 <sup>a</sup> ± 2,29	3,22 <sup>a</sup> ± 1,28
Coagulação com cloreto de magnésio	BRS 267 (F3)	4,90 <sup>b</sup> ± 2,22	2,45 <sup>b</sup> ± 1,19
	Vmax (F4)	4,68 <sup>b</sup> ± 2,17	2,23 <sup>b</sup> ± 1,14

Médias (n=60) ± desvio padrão, seguida de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05);

<sup>1</sup>Escala de aceitação: 1 = desgostei muitíssimo; 9 = gostei muitíssimo;

<sup>2</sup>Escala de intenção de compra: 1 = certamente não compraria; 5 = certamente compraria.

Em relação a intensão de compra, pode-se verificar na Figura 5 que o tofu das formulações F1 (28,33 %) e F2 (30,00 %), para o item da escala “talves compraria” foram as amostras que apresentaram maior porcentagem de intensão de compra, corroborando os resultados de aceitação sensorial. Resultado similar, foi reportado por Daniels (2015), sendo que a grande maioria dos julgadores optou pela escala intermediária ‘talvez compraria, talvez não compraria’, 41 % para o tofu defumado e 37 % para o padrão.

Assim pode-se perceber que são necessárias pesquisas de melhoria de características sensoriais da soja e seus derivados, pois a soja apresenta muitos benefícios a saúde dos consumidores e apresenta qualidade sensorial que ainda não agrada a maioria dos consumidores. De acordo com Silveira et al. (2005), a engenharia genética é bastante importante quando se considera a área de alimentos, pois espera-se que a biotecnologia moderna seja capaz de proporcionar melhoramentos como o aumento da produção e produtividade com diminuição de custos; desenvolvimento de produtos mais seguros e ainda com características sensoriais e nutricionais melhoradas.

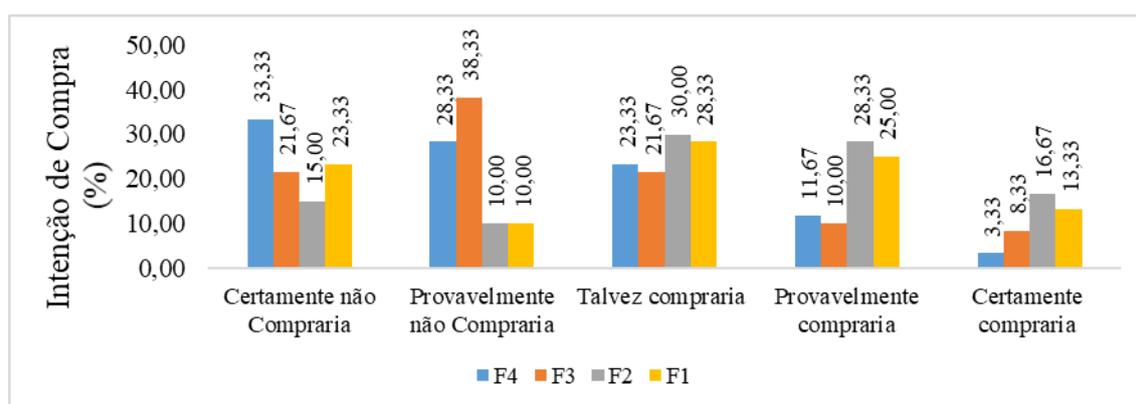


Figura 5: Histograma de Intensão de compra (%) dos tofus das formulações de tofu, F1 – Tofu, Flor do cardo, BRS 267; F2 – Tofu, Flor do cardo, Vmax; F3 – Tofu, Cloreto de magnésio, BRS 267; F4 - Tofu, Cloreto de magnésio, Vmax.

### 2.3.6 Atividade Antioxidante

Em virtude das formulações F1 e F2 terem apresentado maior aceitabilidade e intenção de compra, e nestas ter sido utilizado coagulante vegetal flor do cardo que

possui compostos fenólicos que lhe confere atividade antioxidante (MATOS, 2014), foram avaliadas a atividade antioxidante do extrato de flor do cardo, do EHS da Vmax e da BRS 267, e das formulações de tofus F1 e F2, no primeiro dia do desenvolvimento.

A atividade antioxidante foi expressa em  $IC_{50}$ , que é a quantidade de antioxidante necessária para quantificar a concentração inicial de DPPH em 50 % (BRAND-WILLIAMS et al., 1995), isto significa que quanto menor o valor de  $IC_{50}$  maior será a atividade antioxidante.

O valor de  $IC_{50}$  obtido para extrato da flor do cardo foi de  $0,31 \pm 0,01$  mg/mL, de  $0,59 \pm 0,02$  mg/mL para o EHS da cultivar Vmax, de  $0,41 \pm 0,3$  mg/mL para o EHS da cultivar BRS 267, de  $0,10 \pm 0,01$  mg/mL para a formulação de tofu F1 e de  $0,15 \pm 0,2$  mg/mL para a formulação de tofu F2, de acordo com Figura 6. A diferença entre os valores de  $IC_{50}$  observada entre os tofus pode ser devido a vários fatores tais como a cultivar, as condições climáticas, o estágio de maturação, a forma de armazenamento, à complexidade dos compostos antioxidantes presentes (polaridade e solubilidade), as metodologias de extração do EHS, ao tempo de estocagem dos EHS e dos tofus, entre outros fatores. Como a forma de secagem e armazenamento da flor do cardo (GOUVEIA e CARVALHO, 2012).

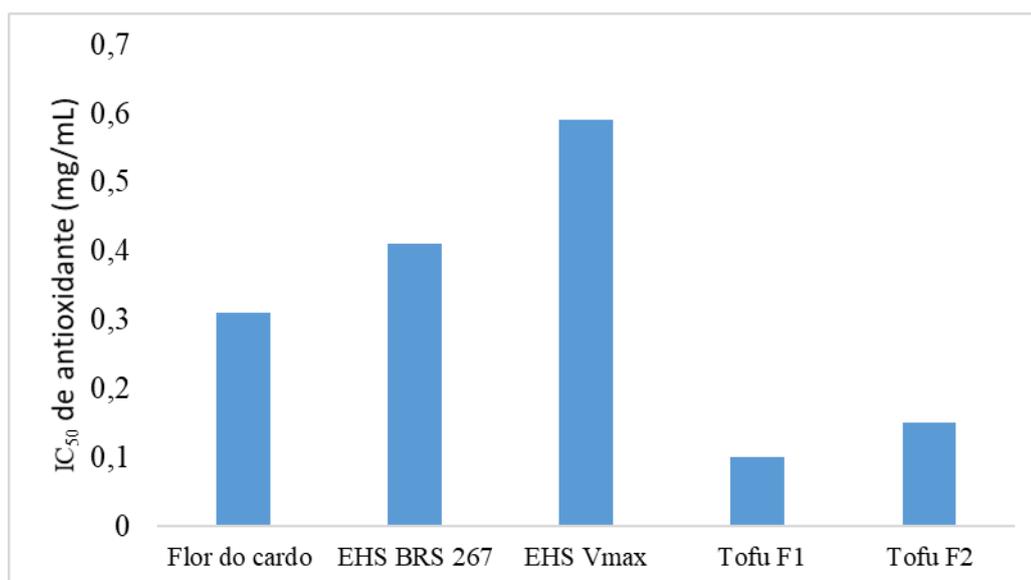


Figura 6: Atividade antioxidante expressa em valores de  $IC_{50}$  para o extrato de flor do cardo, do EHS da Vmax e da BRS 267, e das formulações de tofus F1 e F2

Os antioxidantes presentes em muitos vegetais podem ser de grande benefício e melhoria da qualidade de vida, pois eles apresentam a capacidade de proteger um organismo dos danos motivados pelos radicais livres, através da prevenção que pode adiar o início de várias doenças, como neurodegenerativas (Mal de Alzheimer), cardiovasculares e crônicas (câncer, aterosclerose, artrite reumática, hipertrofia muscular) (Alam et al. 2012; Tinkel et al. 2012; Borut e Raja, 2012).

Desta forma pode-se considerar os valores de antioxidante da flor do cardo muito promissores para utilização em alimentos com potenciais benéficos a saúde e segurança por tratar-se de produto natural (GOUVEIA e CARVALHO, 2012).

### 2.3.7 Análise multivariada: Componentes principais (ACP) e correlação de Pearson

A Tabela 5 e a Figura 7 apresentam a correlação de Pearson e análise dos componentes principais (ACP) das variáveis físico-químicas, sensorial e de textura das formulações de tofu (F1; F2; F3 e F4) no 1º, 7º e 14º dia de armazenamento.

Na Figura 7 encontra-se a Análise dos Componentes Principais (ACP), na qual as variáveis são representadas como vetores, quanto mais longo o vetor, melhor a explicação da variabilidade entre as variáveis. A primeira (CP1) e segunda (CP2) dimensão explicaram 71,41 % da variância total. O componente principal 1 (CP1) respondeu por 42,50 %, enquanto ao componente principal 2 (CP2) por 28,91 %. Para o qual observa-se que houve discriminação entre as formulações de tofu, principalmente F3 e F4 em relação F1, F2, esta discriminação entre as amostras é justificada pelo tipo de coagulante utilizado nas formulações, pois no tofu F1 e F2 utilizou-se flor do cardo e nas formulações F3 e F4  $MgCl_2$  (padrão). A formulação F4 é a que se localiza mais próxima as variáveis pH, cinzas, coesividade e cor (parâmetro  $b^*$ ,  $C^*$  e  $^{\circ}Hue$ ) no 1º, 7º e 14º dia de armazenamento. A F3 apresentou maior ITK, elasticidade, atividade ureática, dureza e gomosidade. A F2 se destacou na aceitação (Tabela 4 e Figura 2), com maior concentração de umidade inicial e durante o 1º, 7º e 14º dias de armazenamento (Tabela 1), possivelmente por apresentar na sua formulação coagulante flor do cardo, o qual influenciou positivamente nas características sensoriais e de umidade do produto durante o armazenamento, maior rendimento, sinérese, lipídios e cor parâmetro  $L^*$ . A formulação F1 apresentou-se mais próxima do teor de proteína, cor (parâmetro  $a^*$ ), ácido fítico e da acidez durante o 1º, 7º e 14º dias. Os valores obtidos por meio de correlação de Pearson (Tabela 5) confirmam a relação entre os parâmetros observados na análise de componentes principais (Figura 7).

O teor de umidade foi correlacionado positivamente ( $p > 0,05$ ) com a proteína, o rendimento, a sinérese e a aceitação, ou seja, indicando que ao aumentar a umidade obteve-se um aumento no conteúdo de proteína, rendimento, sinérese e aceitação. No entanto, a umidade foi correlacionada negativamente pela dureza e gomosidade, indicando que a diminuição da umidade ocasionou o aumento nestes parâmetros de textura.

Já a proteína foi correlacionada positivamente ( $p > 0,05$ ) pela cor  $a^*$ , rendimento, sinérese, e aceitação, isto demonstra que quanto maior o conteúdo de proteína no tofu, maior foi rendimento, sinérese e aceitação. A aceitação foi correlacionada negativamente ( $p < 0,05$ ) com os dados de textura (dureza, gomosidade, elasticidade e coesividade), mostrando que quando as características de textura foram maiores a aceitação do produto foi menor.

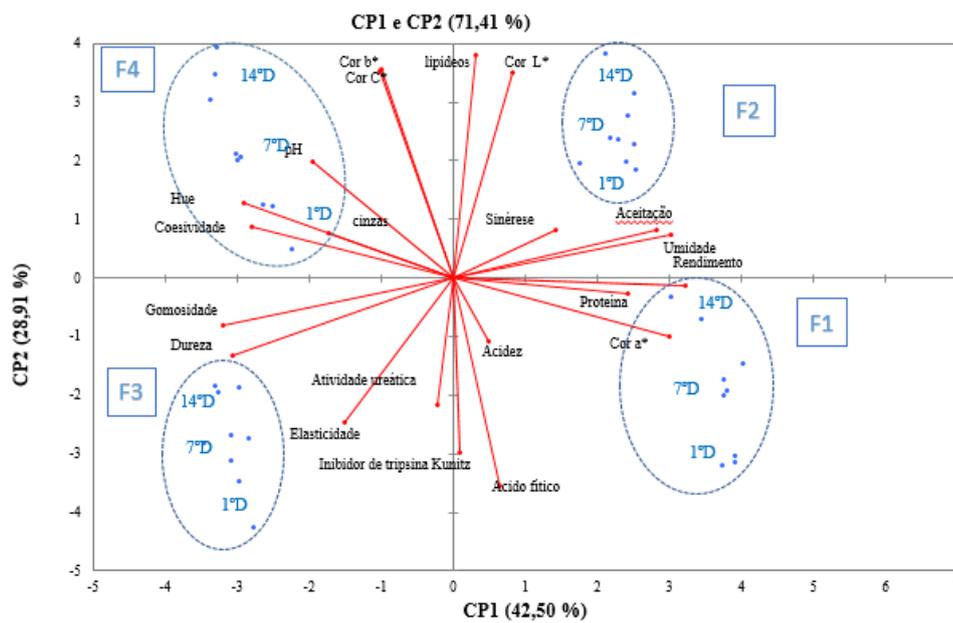


Figura 7: Análise dos Componentes Principais (ACP) das formulações de Tofu (F1 – Tofu, Flor do cardo, BRS 267; F2 – Tofu, Flor do cardo, Vmax; F3 – Tofu, Cloreto de magnésio, BRS 267; F4 – Tofu, Cloreto de magnésio, Vmax) no 1º, 7º e 14º dia de armazenamento.

Tabela 5: Matriz de correlação (r) de Pearson para as variáveis umidade, pH, cinzas, lipídeos, cor L\*, a\*, b\*, C\*, °Hue, Inibidor de tripsina Kunitz, atividade ureática, ácido fítico, acidez, rendimento, sinérese, aceitação, perfil textura (dureza, gomosidade, elasticidade, coesividade) de formulações de Tofu (F1 -, F2 - F3 - e F4 -) no 1º, 7 e 14º dia de armazenamento.

Var	Umi	pH	Cin	Lip	Prot	L*	a*	b*	°Hue	C*	ITK	AU	AF	Aci	Ren	Siner	Ace	Dur	Gom	Elas	Coe	
Umi	<b>1</b>																					
pH	-0,313	<b>1</b>																				
Cin	<b>-0,677</b>	<b>0,732</b>	<b>1</b>																			
Lip	0,250	0,360	0,101	<b>1</b>																		
Prot	<b>0,853</b>	-0,166	<b>-0,465</b>	-0,037	<b>1</b>																	
L*	<b>0,461</b>	<b>0,459</b>	0,054	<b>0,844</b>	0,339	<b>1</b>																
a*	<b>0,803</b>	<b>-0,572</b>	<b>-0,781</b>	-0,161	<b>0,712</b>	0,035	<b>1</b>															
b*	-0,056	<b>0,708</b>	<b>0,506</b>	<b>0,799</b>	-0,199	<b>0,714</b>	<b>-0,467</b>	<b>1</b>														
°Hue	<b>-0,745</b>	<b>0,602</b>	<b>0,776</b>	0,235	<b>-0,675</b>	0,032	<b>-0,994</b>	<b>0,539</b>	<b>1</b>													
C*	-0,051	<b>0,707</b>	<b>0,502</b>	<b>0,800</b>	-0,195	<b>0,716</b>	<b>-0,462</b>	<b>1,000</b>	<b>0,534</b>	<b>1</b>												
ITK	0,037	-0,133	0,000	<b>-0,700</b>	0,417	<b>-0,488</b>	0,307	<b>-0,553</b>	-0,337	<b>-0,553</b>	<b>1</b>											
AU	-0,049	-0,061	-0,056	<b>-0,515</b>	0,139	-0,419	0,048	-0,342	-0,053	-0,343	<b>0,456</b>	<b>1</b>										
AF	0,114	-0,348	-0,247	<b>-0,871</b>	0,410	<b>-0,657</b>	<b>0,469</b>	<b>-0,769</b>	<b>-0,512</b>	<b>-0,768</b>	<b>0,882</b>	<b>0,529</b>	<b>1</b>									
Aci	-0,093	<b>-0,725</b>	-0,415	-0,138	-0,308	-0,401	0,076	-0,429	-0,108	-0,430	-0,163	-0,071	-0,048	<b>1</b>								
Ren	<b>0,909</b>	<b>-0,543</b>	<b>-0,789</b>	0,049	<b>0,769</b>	0,246	<b>0,945</b>	-0,314	<b>-0,921</b>	-0,309	0,125	-0,071	0,260	0,099	<b>1</b>							
Siner	<b>0,651</b>	0,229	-0,114	0,188	<b>0,823</b>	<b>0,508</b>	0,354	0,170	-0,296	0,172	0,272	0,120	0,157	<b>-0,600</b>	<b>0,465</b>	<b>1</b>						
Ace	<b>0,841</b>	<b>-0,457</b>	<b>-0,729</b>	0,321	<b>0,549</b>	0,315	<b>0,680</b>	-0,054	<b>-0,618</b>	-0,050	-0,183	-0,060	-0,047	0,109	<b>0,771</b>	0,374	<b>1</b>					
Dur	<b>-0,913</b>	0,367	<b>0,696</b>	-0,388	<b>-0,662</b>	<b>-0,536</b>	<b>-0,794</b>	-0,003	<b>0,750</b>	-0,008	0,219	0,255	0,105	-0,030	<b>-0,925</b>	<b>-0,465</b>	<b>-0,823</b>	<b>1</b>				
Gom	<b>-0,941</b>	<b>0,462</b>	<b>0,772</b>	-0,284	<b>-0,697</b>	-0,412	<b>-0,839</b>	0,112	<b>0,793</b>	0,107	0,131	0,145	-0,015	-0,066	<b>-0,945</b>	<b>-0,466</b>	<b>-0,909</b>	<b>0,976</b>	<b>1</b>			
Elas	-0,359	0,294	0,402	<b>-0,677</b>	0,066	<b>-0,480</b>	-0,192	-0,308	0,148	-0,310	<b>0,772</b>	<b>0,463</b>	<b>0,673</b>	-0,393	-0,386	0,104	<b>-0,562</b>	<b>0,629</b>	<b>0,570</b>	<b>1</b>		
Coe	-0,314	<b>0,688</b>	<b>0,655</b>	0,137	-0,048	0,257	-0,386	0,402	0,385	0,401	0,243	-0,043	-0,068	<b>-0,466</b>	-0,395	0,143	<b>-0,641</b>	0,374	<b>0,494</b>	<b>0,449</b>	<b>1</b>	

Os valores em negrito são diferentes de 0 ( $r > 0,45$ ) com um nível de significância  $\alpha = 0,05$ . \*\* (F1 – Tofu, Flor do cardo, BRS 267; F2 – Tofu, Flor do cardo, Vmax; F3 – Tofu, Cloreto de magnésio, BRS 267; F4 – Tofu, Cloreto de magnésio, Vmax. Var = variáveis, Umi = umidade, Cin = cinzas, Lip = lipídios, Prot = proteína, ITK = Inibidor de Tripsina Kunitz, AU = Atividade ureática, AF = Ácido fítico, Aci = Acidez, Ren = Rendimento, Siner = sinérese, Acei = aceitação, Dur = dureza, Gom = gomosidade, Elas = elasticidade, Coe = coesividade.

## 2.4 CONCLUSÃO

Os tofus elaborados com coagulante flor do cardo, independente da cultivar de soja utilizada, apresentaram o maior índice de aceitabilidade e de intenção de compra em relação aos tofus obtidos com coagulante cloreto de magnésio. Também apresentaram aspecto visual mais cremoso, maior sinérese e maior rendimento. Ao final do armazenamento, estes tofus mantiveram suas características nutricionais e microbiológicas satisfatórias. Os tofus elaborados com flor do cardo apresentaram capacidade antioxidante próspera. Portanto, o tofu elaborado com coagulante vegetal flor do cardo é uma alternativa promissora para os consumidores veganos e intolerantes a lactose.

## 2.5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio grande do Sul (FAPERGS) e a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária).

## 2.6 REFERÊNCIAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Escalas utilizadas em análise sensorial de alimentos e bebidas – NBR 14141. Rio de Janeiro: ABNT, 1998. 3 p.
- AOAC. Association Of Official Analytical Chemists, Official Methods Of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18th ed. Washington: AOAC, 3000 p. 2007.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- ALMEIDA, D.; VENTURA, D.; PEREIRA, D.; LAGES, S. Produção de queijo serra da estrela. Processamento Geral de Alimentos. **Escola Superior Agrária**. Instituto Politécnico de Coimbra, 2010. [http://www.esac.pt/noronha/pga/0910/Trabalhos\\_mod1/Produ%C3%A7%C3%A3oQ ueijoSerradaEstrela.pdf](http://www.esac.pt/noronha/pga/0910/Trabalhos_mod1/Produ%C3%A7%C3%A3oQ ueijoSerradaEstrela.pdf)
- BARRACOSA, P.; OLIVEIRA, J.; BARROS, M.; PIRES, E. Morphological evaluation of cardoon (*Cynara cardunculus* L.): assessing biodiversity for applications based on tradition, innovation and sustainability. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 65, nº 1, p. 17–28, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0579-0>
- BAUSCH, A. B. Desenvolvimento de extrato solúvel de soja com valor nutricional, biodisponibilidade de isoflavonas e prospecção de consumo. **Dissertação** (Mestrado Profissional – Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2019.
- BENASSI, V. T.; FELBERG, I.; ALVARENGA, A. L. B.; MANDARINO, J. M. G. Tofu. Agregando valor a pequena produção. Embrapa informação tecnológica- Brasília- DF. 1ª edição, p. 39, 2007.

- BENASSI, V. T.; BENASSI, M. T.; PRUDENCIO, S. H. Cultivares brasileiras de soja: Características para a produção de tofu e aceitação pelo mercado consumidor. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, nº 1, p. 1901-1914, 2011. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32Suplp1901>.
- BENASSI, V.T.; VÁREA, G.S.; PRUDENCIO, S.H. Tofus de diferentes cultivares de soja: perfil sensorial e correlação com as medidas instrumentais e de composição química. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, nº 4, p. 555-565, 2012. <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/972292/1/tofus.benassi.pdf>
- BENASSI, V. T.; PRUDENCIO, S. H. Impactos do processamento de soja na retenção de minerais, isoflavonas e proteínas em tofus. **Alimentos e Nutrição – Braziliam Journal of Food and Nutrition, Araraquara**, v.24, nº 1, p.51-59, 2013. <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/969409/1/impactos.benassi.2013.pdf>
- BOSI, M. G. Desenvolvimento de processo de fabricação de requeijão light e de requeijão sem adição de gordura com fibra alimentar. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. 2008.
- BORGES, L. C.; SILVEIRA, A. P. C.; STARLING, C. A.; SIQUEIRA, K. F. Programa Nutricional para a Melhoria da Saúde do Trabalhador por meio da Adição de Alimento Funcional. In: **Aproveitamento de Resíduos Industriais de Alimentos com Potencial Aplicação em Cosméticos Naturais**. Revista Processos Químicos / SENAI. Departamento Regional de Goiás, v.10, nº 20, 2016.
- BORUT, P.; RAJA, D. Free Radicals and Extrinsic Skin Aging. *Dermatology Research and Practice*, v. 2012, p. 1-4, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/135206>
- BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER ME, BERSSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, nº 1, p. 25-30, 1995. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- BRASIL, Método NE 20 Atividade Ureática. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, seção 1, p. 35, 1991.
- BRASIL, Ministério da Saúde - MS, Agência Nacional de Vigilância Sanitária- Anvisa. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União; Poder Executivo, 10 de janeiro de 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde – MS, Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. **Aprova as Diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 jun. 2013.
- BRASIL, Ministério da Saúde – MS, Agência Nacional de Vigilância Sanitária- Anvisa. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. **Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da União, nº 249, de 26 de dezembro de 2019a.
- BRASIL, Ministério da Saúde – MS, Agência Nacional de Vigilância Sanitária- Anvisa. RDC Nº 331, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019. **Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação**. Diário Oficial da União, nº 249, de 26 de dezembro de 2019b.

- CANTELLI, K. C.; SCHMITD, J. T.; OLIVEIRA, M. A.; STEFFENS, J.; STEFFENS, C.; LEITE, R. S.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Brotos de linhagens genéticas de soja: avaliação das propriedades físico-químicas. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 20, p. 10, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.7416>
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BERTAGNOLLI, P. F.; STRIEDER, M. L.; COSTAMILAN, L. M.; MOREIRA, J. U. V. **Melhoramento de Soja para Alimentação Humana na Embrapa Trigo – Safra Agrícola 2011/2012**. Passo Fundo/RS. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Trigo. p. 27-31, 2012. Disponível em: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do145\\_4.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do145_4.htm) Acesso em 09 de julho de 2020.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; SILVA, J. B. Soja na alimentação humana: qualidade na produção de grãos com valor agregado. In: Congreso De La Soja Del Mercosur, 5., 2011. Resumos. Rosário: Asociaciones de la Cadena de la Soja Argentina, p. 1-3, 2011.
- CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 171, p. 501-505, 1947.
- CHIBEBA, A. M.; KYEI-BOAHENC, S.; GUIMARÃES, M. F.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRI, M. Feasibility of transference of inoculation-related technologies: A case study of evaluation of soybean rhizobial strains under the agro-climatic conditions of Brazil and Mozambique. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 261, p. 230-240, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.06.037>
- CHUA, J.; LU, Y e LIU, L. Evaluation of five commercial non-Saccharomyces yeasts in fermentation of soy (tofu) whey into an alcoholic beverage. **Food Microbiology**, v. 76, p. 533-542, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.07.016>
- CIABOTTI, S.; BARCELOS, M.F.P.; PINHEIRO, A.C.M.; CLEMENTE, P.R.; LIMA, M.A.C. Características sensoriais e físicas de extratos e tofus de soja comum processada termicamente e livre de lipoxigenase. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, nº 3, p. 643-648, 2007. <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/451-6656-2-PB.pdf>
- CIABOTTI, S.; BARCELOS, M. F. P.; CIRILLO, M. A.; PINHEIRO, A. C. M. Sensorial and technologic properties of product similar to tofu obtained with whey and soymilk addition. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, nº 2, p. 346-353, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000200017>
- CIABOTTI, S.; SILVA, A. C. B. B.; JUHASZ, A. C. P.; MENDONÇA, C. D.; TAVANO, O. L.; MANDARINO, J. M. G.; GONÇALVES, C. A. A. Chemical composition, protein profile, and isoflavones content in soybean genotypes with different seed coat colors. **International Food Research Journal**, v. 23, nº 2, p. 621-629, 2016. [http://www.ifrj.upm.edu.my/23%20\(02\)%202016/\(23\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/23%20(02)%202016/(23).pdf)
- DAHMER, A. M.; RIGO, A. A.; STEFFENS, J.; STEFFENS, C.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Thermal treatment for soybean flour processing with high-quality color and reduced Kunitz trypsin inhibitor. **Journal Of Food Process Engineering**, v. 41, p. 1-8, 2018. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12925>

- DANIELS, JULIANO. Desenvolvimento e caracterização de tofu defumado. **Dissertação** - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Londrina, 2015. [http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/1105/1/LD\\_PPGTAL\\_M\\_Daniels%20C%20Juliano\\_2015.pdf](http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/1105/1/LD_PPGTAL_M_Daniels%20C%20Juliano_2015.pdf)
- DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 4. ed. Curitiba: Champagnat, 2013. 531 p.
- EVANS, D. E.; TSUKAMOTO, C.; NIELSEN, N. C. A small scale method for the production of soymilk and silken tofu. **Crop Science**, v. 37, p. 1463-1471, 1997. <https://doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183X003700050008x>
- FAION, A. M; MENEGOTTO, A. L. L.; FERNANDES, I. A.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J.; VALDUGA, E. Production of Serra da Estrela cheese from ultrafiltered sheep's milk. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 32, nº 5, p. 384-390, 2020. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2020.v32.i5.2109>
- FASOYIRO, S. B. Physical, chemical and sensory qualities of Roselle water extract-coagulated tofu compared with tofu from two natural coagulants. Official Journal of Nigerian Institute of **Food Science and Technology**, v. 32, nº 2, p. 97-102, 2014. [https://doi.org/10.1016/S0189-7241\(15\)30123-5](https://doi.org/10.1016/S0189-7241(15)30123-5)
- FEI, Y.; LIU, L.; LIU, D.; CHEN, L.; TAN, B.; FU, L.; LI, L. Investigation on the safety of lactobacillus amylolyticus L6 and its fermentation properties of tofu whey, **LebensmittelWissenschaft und Food and Science and technology**, v. 84, p. 314-322, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.072>
- FOLGADO, A. ABRANCHES, R. Thistle and the cheese industry: biotechnological tools for the production of enzymes for milk coagulation. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, nº 3, p. 817-828, 2019. <https://doi.org/10.19084/rca.17565>
- FURNOLS, M. F. I.; REALINI, C. E.; GUERRERO, L.; OLIVER, M. A, SAÑUDO, C.; CAMPO, M. M.; NUTE, G. R.; CAÑEQUE, V.; ALVAREZ, I.; SAN JULIÁN, R.; LUZARDO, S.; BRITO, G.; MONTOSSI, F. Acceptability of lamb fed on pasture, concentrate or combinations of both systems by European consumers. **Meat Science**, v. 81, nº 1, p.196-202, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.07.019>
- GARCÍA, V; ROVIRA, S; TERUEL, R; ROA, I; LÓPEZ, M.B. Empleo de coagulantes vegetales en leche de cabra. **Anales de Veterinaria de Murcia**, v. 27, p. 73-84, 2011.
- GÓES-FAVONI, S.P; DORTA, C.; SHIMITE, A.S.O; SOUZA FILHO, W.F.; SILVA, W.F. Obtenção de tofu pela ação conjunta de transglutaminase microbiana e sulfato de magnésio. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Gramado –RS: 24-27 Out 2016.
- GÓES-FAVONI, S. P.; DORTA, C.; SHIGEMATSU, E.; TANAKA, A. Y.; HINTER, M. H.; CARDOSO, J. R. Structured tofu with microbial transglutaminase and addition of Lactobacillus reuteri dsm 17938. **Revista Alimentus**, nº 6, p. 75-90 2019. [http://novosite.fatecmarilia.edu.br/arquivos/revista/Revista\\_AlimentusEdicao\\_6.pdf](http://novosite.fatecmarilia.edu.br/arquivos/revista/Revista_AlimentusEdicao_6.pdf)
- GOUVEIA, S. C.; CASTILHO, P. C. Phenolic composition and antioxidante capacity of cultivated artichoke, Madeira cardoon and artichoke-based dietary supplements. **Food research international**, v. 48, p. 712-724, 2012.

- GRANATO, D.; MASSON, M. L. Instrumental color and sensory acceptance of soy-based emulsions: a response surface approach. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n° 4, p. 1090-1096, 2010.
- GU, E. J.; KIM, D. W.; JANG, G. J.; SONG, S. H.; LEE, J. I.; LEE, S. B.; KIM, H. J. Massbased metabolomic analysis of soybean sprouts during germination. **Food chemistry**, p. 311-319, fev. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.113>
- GUO, Y.; HU, H.; WANG, Q.; LIU, H. A novel process for peanut tofu gel: Its texture, microstructure and protein behavioral changes affected by processing conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 96, p. 140-146, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.020>
- HE, F. J.; CHEN, J. Q.; Consumption of soybean, soy foods, soy isoflavones and breast cancer incidence: Differences between Chinese women and women in Western countries and possible mechanisms. **Food Science and Human Wellness**, v. 2, p. 146-161, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2013.08.002>
- HASSAN, A. N.; FRANK, J. F.; SCHMIDT, K. A.; SHALABI, S. I. Textual proprieties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 12, p. 2098-2103, 1996.
- IAL. (Instituto Adolfo Lutz). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, p. 21-22, 2008.
- YANG, AIJUN e JAMES, ANDREW. T. Effects of soybean protein composition and processing conditions on silken tofu properties. **Jornal of Science and Food Agriculture**, v. 93, n° 12, p. 3065-3071, 2013. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6140>
- YUAN, S.; CHANG, S. K. C., Texture profile of tofu as affected by instron parameters and sample preparation, and correlations of instron hardness and springiness with sensory scores. **Jornal of Food Science**, v. 72, n° 2, p. 136-145, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00263.x>
- YUSEF, J. Extracción de Proteasas de *Ulex europaeus* L.y su potencial utilización comosustituto de cuajo. **Tesis** (Universidad Austral de Chile), 2004. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fap4381e/pdf/fap4381e.pdf>
- JAYASENA, V.; TAH, W.Y.; NASAR-ABBAS, S.M. (2014). Effect of coagulant type and concentration on the yield and quality of soy-lupin tofu. **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, v. 6, p. 159-166, 2014. <https://doi.org/10.3920/QAS2012.0176>
- KAMIZAKE, N.K.K.; SILVA, L.C.P.; PRUDENCIO, S.H. Effect of soybean aging on the quality of soymilk, firmness of tofu and optimum coagulant concentration. **Food Chemistry**, v. 190, p. 90-96, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.041>
- KAO, F. J.; SU, N. W.; LEE, M. H. Effect of calcium sulfate concentration in soymilk on the microstructure of firm tofu and the protein constitutions in tofu whey. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n° 21, p. 6211-6216, 2003. <https://doi.org/10.1021/jf0342021>
- KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v.51, n. 3, p. 376-382, mai./Jun, 1974.

- KUMAR, V.; RANI, A.; RAJPAL, S.; SRIVASTAVA, G.; RAMESH, A.; JOSHI, O. P. Phytic acid in Indian soybean: genotypic variability and influence on growing location. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 86, n° 9, p. 1523-1526, 2005. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2151>
- LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n° 5259, p. 680-685, 1970.
- LATTA, M.; ESKIN, M. A simple and rapid method for phytate determination. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 28, p. 313-315, 1980.
- LEE, D. Y.; KWON, K. H.; CHAI, C.; OH, S. W. Microbial contamination of tofu in Korea and growth characteristics of *Bacillus cereus* isolates in tofu. **Food Science and Technology**, v. 78, p. 63-69, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.081>
- LEE, K. Y.; RAHMAN, M. S.; KIM, A. N.; GUL, K.; KANG, S. W.; CHUN, J.; CHOI, S. G. Quality characteristics and storage stability of low-fat tofu prepared with defatted soy flours treated by supercritical-CO<sub>2</sub> and hexane. **Technologie- Food Science and Technology**, v. 100, p. 237-243, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.073>
- LI, J.; QIAO, Z.; TATSUMI, E.; SAITO, M.; YIN, L. A novel approach to improving the quality of bittern-solidified tofu by w/o controlled-release coagulant using the improved coagulant in tofu processing and product evaluation. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n° 7, p. 1801– 1808, 2013. <http://ir.nsf.gov.cn/paperDownload/1000006435934.pdf>
- LI, J.; CHENG, Y.; TATSUMI, E.; SAITO, M.; YIN, L. The use of W/O/W controlled-release coagulants to improve the quality of bittern-solidified tofu. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 627–635, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.08.002>
- LI, M.; CHEN, F.; YANG, B.; LAI, S.; YANG, H.; LIU, K.; BU, G.; FU, C.; DENG, Y. Preparation of organic tofu using organic compatible magnesium chloride incorporated with polysaccharide coagulants. **Food Chemistry**, v. 167, p. 168-174, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.102>
- LIU, H. H.; CHIEN, J. T.; KUO, M. I. Ultra high pressure homogenized soy flour for tofu making. **Food Hydrocolloids**, v. 32, p. 278-285, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.01>
- MAIA, M.J.L.; ROSSI, E.A.; CARVALHO, R.B. Qualidade e rendimento do leite de soja da unidade de produção de derivados da soja – Unisoja FCF-Ar/UNESP. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n° 1, p. 65-72, 2006. <http://dx.doi.org/10.3895/S1981-36862014000200008S1>
- MATOS, J. M. D. Estudo da secagem da flor de cardo e análise de polissacarídeos e compostos fenólicos. Dissertação de Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar, Instituto Politécnico do Viseu, Julho, 2014.
- MENG, S.; CHANG, S.; GILLEN, A. M.; ZHANG, Y. Protein and quality analyses of accessions from the USDA soybean germplasm collection for tofu production. **Food Chemistry**, v. 213, p. 31-39, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.046>
- MCGUIRE, R. G.; Reporting of Objective Color Measurements. **Hort Science**, v. 27, n° 12, p. 1254- 1255, 1992.

- MINOLTA. The Essentials of Imaging, Manual Guide. [sl]: Minolta Co. Ltd., p. 18-21, 2006.
- MIRANDA, A. L. P.; FRAGA, C. A. M. Atividade seqüestradora de radical livre determinação do potencial antioxidante de substâncias bioativas. In: MONGE, A.; GANELLIN, C. R. **Practical Studies for Medicinal Chemistry**, p.79-82, 2006.
- PAULETTO, F. B. e FOGAÇA, A. O. Evaluation of the centesimal composition of tofu and okara. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 13, nº 1, p. 85-95, 2012.  
<https://periodicos.ufn.edu.br/index.php/disciplinarumS/article/view/993/937>
- PERFEITO, D. G. A.; CORRÊA, I. M.; PEIXOTO, N. Elaboração de bebida com extrato hidrossolúvel de soja saborizada com frutos do cerrado. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 4, nº 1, p. 21-27, 2017.
- PRABHAKARAN, M. P.; PERERA, C. O.; VALIYAVEETIL, S. Effect of different coagulants on the isoflavone levels and physical properties of prepared firm tofu. **Food Chemistry**, nº 99, p. 492-499, 2006.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.011>
- RIBEIRO, T. T. B. C.; COSTA, G.; COSTA, M. Microbial contamination in industrial tofu. **Food technology Ciencia Rural**, v. 47, nº 3, p. 1-6, 2017.  
<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160234>
- RIGO, A. A.; DAHMER, A. M.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Characterization of Soybean Cultivars Genetically Improved for Human Consumption **International Journal of Food Engineering**, v. 1, n 1, p. 1-7, 2015.  
<https://doi.org/10.18178/ijfe.1.1.1-7>
- SADEGHI, A. A.; SHAWRANG. P. Effects of microwave irradiation on ruminal degradability and in vitro digestibility of canola meal. **Animal Feed Science and Technology**, v. 127, nº 1, p. 45-54, 2006.  
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.08.016>
- SANTOS, D. A. M.; LOBO, J. S. T.; ARAÚJO, L. M., DELIZA, R.; MARCELLINI, P. S. Free choice profiling, acceptance and purchase intention in the evaluation of different biscuit formulations. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, nº 6, p. 613-623. 2015. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542015000600008>
- SCHERER, G. C. R. S.; AMBRÓSIO, N.; FERNANDES, I. A.; STEFFENS, C.; VALDUGA, E.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; ZENI, J.; STEFFENS, J. Maximization of maceration step of obtaining water-soluble soy extract process. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, nº 3, p. 28197-28215, 2021.  
<https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-507>
- SCHMIDT, J. T.; CANTELLI, K.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J.; ZENI, J. Effects of vegetable coagulants in the production and storage of tofu. **Global Science and Technology**, v. 10, nº 01, p. 188-198, 2017.  
<file:///C:/Users/Usuario/Downloads/897-5604-1-PB.pdf>
- SERRAZANETTI, D.I.; NDAGIJIMANA, M.; MISEROCCHI, C.; PERILLO, L.; GUERZONI, E. Fermented tofu: Enhancement of keeping quality and sensorial properties. **Food Control**, v. 34, nº 2, p. 336-346, 2013.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.047>

- SENSING, K. M. Comunicação precisa de cor: Controle de qualidade da percepção à instrumentação. Japão, 1998.
- SILVA, S. V.; BARROS, R. M.; MALCATA, F. X. Hydrolysis of Caseins By Extracts of *Cynara Cardunculus* Precipitated by Ammonium Sulfate. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 1746-1751, 2002. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08717.x>
- SILVA, C. F. G.; SANTOS, F. L.; SANTANA, M. V. L.; SILVA, M. V. L.; CONCEIÇÃO, T. A. Development and characterization of a soymilk Kefir-based functional beverage. **Food Science and Technology**, Campinas, Ahead of Print, p. 1-8, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.10617>
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. D. A.; TANIWAKI, M.H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. Ed. Livraria Varela, 2007. 536p.
- SILVEIRA, J. M. F. J.; BORGES, I. C.; BUAINAIN, A. M. Biotecnologia e Agricultura da ciência e tecnologia aos impactos da inovação. **São Paulo em Perspectiva**, v. 19, nº 2, p. 101-114, 2005. <https://www.scielo.br/pdf/spp/v19n2/v19n2a09>
- SOARES R. Estudo da acção anti-tumoral do extracto de cipsosina, isolado de *Cynara cardunculus*. **Tese de Mestrado**, Universidade do Algarve, Portugal, 2008. <http://hdl.handle.net/10400.1/338>
- THEODOROPOULOS, V. C. T.; TURATTI, M. A.; GREINER, R.; MACEDO, G. A.; PALLONE, J. A. M. Effect of enzymatic treatment on phytate content and mineral bioaccessibility in soy drink. **Food Research International**, v. 108, p. 68-73, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.018>
- TINKEL, J.; HASSANAIN, H.; KHOURI, S. J. Cardiovascular Antioxidant Therapy: A Review of Supplements, Pharmacotherapies, and Mechanisms. **Cardiology in Review**, v. 20, n. 2, p. 77-83, 2012. <https://doi.org/10.1097/CRD.0b013e31823dbbad>
- TSOUPRAS, A.; LORDAN, R.; ZABETAKIS, I. Inflammation, not cholesterol, is a cause of chronic disease. **Nutrients**, v. 10, nº 5, p. 604, 2018. <https://doi.org/10.3390/nu10050604>
- VIEIRA, J. P.; OLIVEIRA FILHO, J. G.; SANTOS, D C.; EGEA, M. B. Study of the fermentative process of soybean beverage (glycine max) added with fructose and sucralose. **Revista eixo**, v. 7, nº 1, p. 17-25, 2018. [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/467-Texto%20do%20artigo-2395-1-10-20180629%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/467-Texto%20do%20artigo-2395-1-10-20180629%20(1).pdf)
- WANG, K.; YU, J.; LIU, H.; LIU, Y.; LIU, N.; CAO, Y.; ZHANG, X.; SOL D. Endemic Kashin-Beck disease: A food-sourced osteoarthropathy. **Seminários de Artrite e Reumatismo**, v. 50, ed. 2, p. 366-372, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2019.07.014>
- ZUO, F.; PENG, X.; SHI, X.; GUO, S. Effects of high-temperature pressure cooking and traditional cooking on soymilk: Protein particles formation and sensory quality. **Food Chemistry**, v. 209, p. 50-56, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.026>



## 4 CONCLUSÕES

A partir da soja pode-se desenvolver extrato hidrossolúvel, que apresenta várias etapas para a sua obtenção, como a maceração, que de acordo com a literatura pode ser realizada por 16 h. Os resultados deste estudo demonstram que é possível a redução do tempo de 16 h para 6 h e utilizando temperatura de 45 °C. Foram obtidos EHS das cultivares BRS 267 e Vmax com teores de proteína acima de 3 %, respeitando o que preconiza a legislação (teor de proteína maior de 3 %). Sendo assim, as duas cultivares de soja tem potencial para utilização na indústria de alimentos para o desenvolvimento de produtos alimentícios humanos, desde que seguidas regras de processamento para promover a correta inativação de componentes anti-nutricionais.

A partir do EHS foram desenvolvidos tofus utilizando a flor do cardo e cloreto de magnésio como coagulante. Os resultados de textura para as quatro amostras de tofu apresentaram considerável variabilidade entre as amostras, nos diferentes tempos de armazenamento testados (1º, 7º e 14º dias). Os dados de análises físicas e químicas mostraram-se tecnologicamente favoráveis ao consumo humano. Através da análise sensorial percebeu-se que todos os tofus desenvolvidos apresentaram Índice de aceitabilidade acima de 50%, sendo que os tofus desenvolvidos com flor do cardo são promissores por apresentarem resultados acima do coagulante comercial. Os resultados demonstram que o produto desenvolvido com coagulante vegetal pode representar uma alternativa para os consumidores veganos e intolerantes a lactose.

Este trabalho é de grande relevância, pois levou conhecimento deste produto a muitos consumidores. Os produtos a base de soja como o tofu, que nem sempre é conhecido e tem grande importância devido a suas características nutricionais, deve ser mais difundido entre os consumidores de forma geral, tanto através de pesquisas, como de transferência do conhecimento para a população.

## **5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Realizar caracterização detalhada da flor do cardo;
- Pesquisar alternativas para aplicação do okara do EHS e do soro do tofu em alimentos;
- Desenvolver tofus temperados e realizar análise sensorial;
- Testar outros coagulantes vegetais que apresentam propriedades coagulantes.

## 6 APÊNDICES DO PRESENTE ESTUDO

### Apêndice 6.1: Termo de consentimento livre e esclarecido

Eu, **Glaciela Cristina Rodrigues Da Silva Scherer**, aluna do Doutorado em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada – Câmpus de Erechim estou desenvolvendo uma pesquisa intitulada **“AVALIAÇÃO SENSORIAL DE TOFUS DESENVOLVIDOS A PARTIR DAS CULTIVARES DE SOJA BRS 267 E VMAX UTILIZANDO DIFERENTES COAGULANTES”**.

O objetivo será desenvolver tofu a partir duas cultivares de soja (Vmax e BRS 267), utilizando diferentes coagulantes, para então realizar análise sensorial dos diferentes tofus. Os dados serão coletados individualmente através de questionário, de análise sensorial utilizando o teste de aceitação. Cada participante será conduzido a uma cabine individual onde receberá 4 amostras de tofu juntamente com uma ficha de avaliação. Após provar os produtos os participantes preencherão a ficha conforme o seu parecer. As amostras não representam riscos à saúde dos participantes, pois serão realizadas análises microbiológicas antes da análise sensorial.

No decorrer e após a pesquisa será mantido o sigilo das informações obtidas e/ou qualquer dado que possa permitir identificação do participante, garantindo-lhes o anonimato. Posteriormente estes dados poderão ser utilizados para elaboração de artigos e divulgação nos meios científicos e apresentação em eventos.

Fica claro que não existirão despesas ou compensações pessoais para os participantes em qualquer fase de estudo e ocorrendo alguma dúvida em relação ao mesmo, poderão entrar em contato pelo telefone (54)35209000 ou [glaciela.cristina@yahoo.com.br](mailto:glaciela.cristina@yahoo.com.br)

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG \_\_\_\_\_ fui esclarecido (a) sobre a pesquisa “Desenvolvimento de tofu, com as cultivares de soja BRS 267 e Vmax, com a utilização de diferentes coagulantes”. Aceito participar voluntariamente e concordo que meus dados sejam utilizados na realização e publicação da mesma.

Erechim, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019.

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Orientador

Jamile Zeni

RG: 1078251236

Email: [jamilezeni@uricer.edu.br](mailto:jamilezeni@uricer.edu.br)

Fone : (54) 3520-9000- ramal 9115

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

Glaciela Cristina R. S. Scherer

RG: 1076628401

Email: [glaciela.cristina@yahoo.com.br](mailto:glaciela.cristina@yahoo.com.br)

## Apêndice 6.2: Ficha de avaliação sensorial dos tofus.

## Questionário Anônimo de Análise Sensorial

Informações para o(a) participante voluntário(a):

Você está convidado(a) a responder este questionário anônimo que faz parte da coleta de dados do trabalho “**AVALIAÇÃO SENSORIAL DE TOFUS DESENVOLVIDOS A PARTIR DAS CULTIVARES DE SOJA BRS 267 E VMAX UTILIZANDO DIFERENTES COAGULANTES**”. Sob execução da aluna **Glaciela Cristina Rodrigues Da Silva Scherer** e sob responsabilidade das pesquisadoras Profs. Juliana Steffens e Jamile Zeni. Caso você concorde em participar da pesquisa, leia com atenção os seguintes pontos: a) você é livre para, a qualquer momento, recusar-se a responder às perguntas que lhe ocasionem constrangimento de qualquer natureza; b) você pode deixar de participar da pesquisa e não precisa apresentar justificativas para isso; c) sua identidade será mantida em sigilo; d) caso você queira, poderá ser informado(a) de todos os resultados obtidos com a pesquisa, independentemente do fato de mudar seu consentimento em participar da pesquisa; e) **ALERGÊNICOS: Atenção, este produto contém soja.**

Questionário:

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Sexo:

- ( ) Masculino  
( ) Feminino

Idade:

- ( ) 18 a 20 anos  
( ) 21 a 30 anos  
( ) 31 a 40 anos  
( ) 41 a 50 anos  
( ) > 50 anos

Escolaridade

- ( ) 1º grau incompleto  
( ) 1º grau completo  
( ) 2º grau incompleto  
( ) 2º grau completo  
( ) Superior  
( ) Pós graduação

**Frequência de consumo de tofu de soja:**

- ( ) 1 vez por mês; ( ) 1 vez por semana; ( ) 2 vezes por semana;  
( ) mais de 2 vezes por semana; ( ) não tenho o hábito de consumo.

Por favor, prove as amostras codificadas de tofu, da esquerda para direita e indique o quanto gostou ou desgostou utilizando a escala abaixo.

9- Gostei muitíssimo

8- Gostei muito

7- Gostei moderadamente

6- Gostei ligeiramente

5- Nem gostei / nem desgostei

4- Desgostei ligeiramente

3- Desgostei moderadamente

2- Desgostei muito

1- Desgostei muitíssimo

Amostra n°

Pontuação

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Indique a intenção de compra dos tofus, utilizando a escala abaixo:

5- Certamente compraria

Amostra n°

Pontuação

4- Provavelmente compraria

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

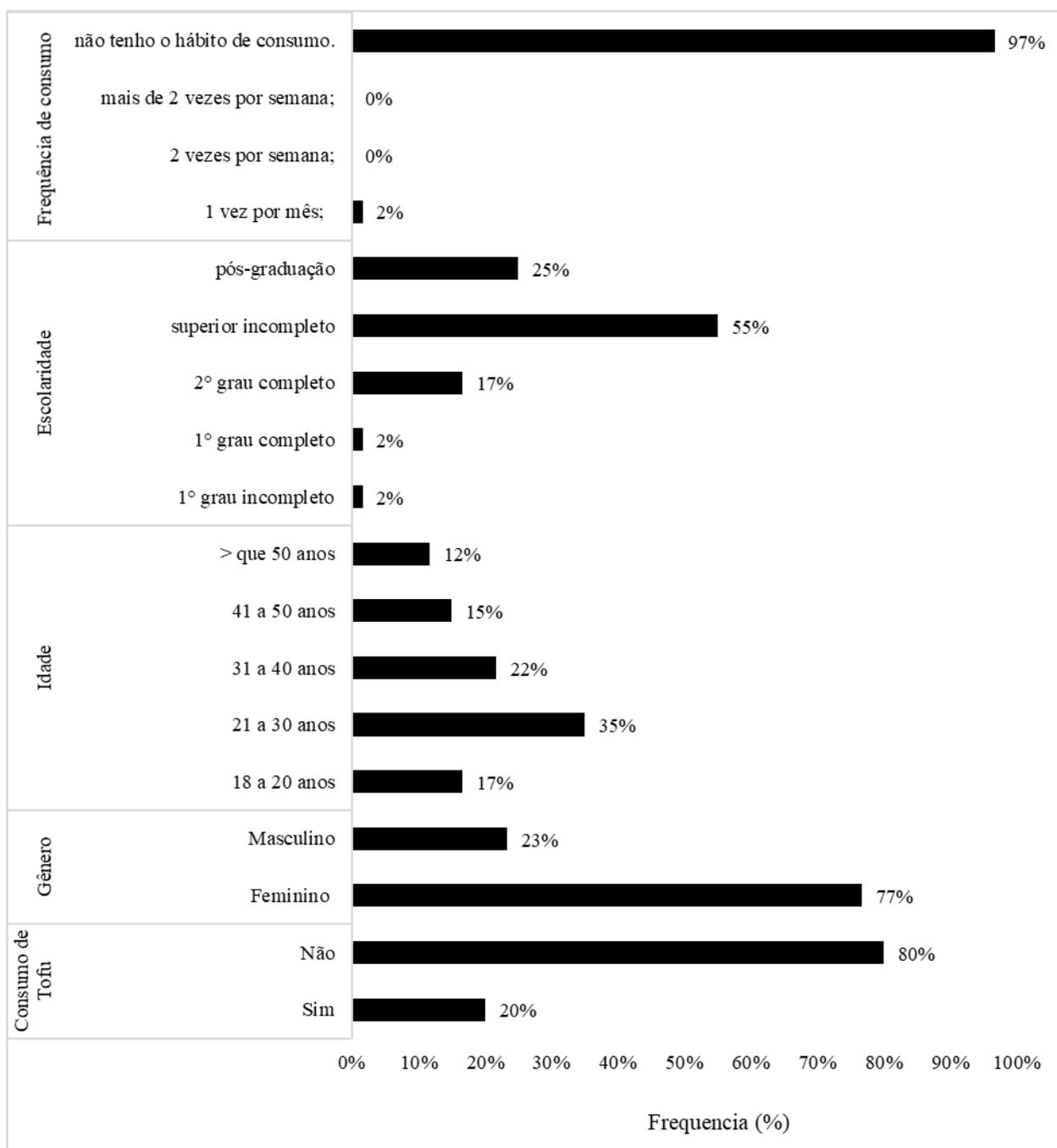
3- Talvez compraria

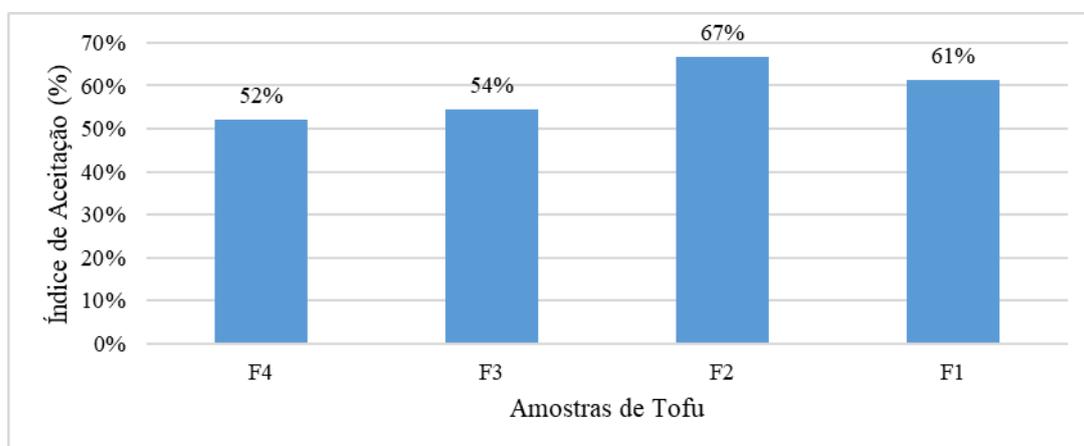
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

- 2- Provavelmente não compraria \_\_\_\_\_  
 1- Certamente não compraria \_\_\_\_\_

Apêndice 6.3: Figura com o perfil dos avaliadores da análise sensorial, frequência de consumo de tofu, escolaridade, idade, gênero e consumo de tofu.





Apêndice 6.4: Figura do Histograma de Índice de aceitação global (%) dos tofus. F1 – Tofu, Flor do cardo, BRS 267; F2 – Tofu, Flor do cardo, Vmax; F3 – Tofu, Cloreto de magnésio, BRS 267; F4 - Tofu, Cloreto de magnésio, Vmax.