



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

JÉSSICA TAMIOZZO SCHMIDT

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE QUEIJO TIPO
TOFU UTILIZANDO COAGULANTES VEGETAIS

ERECHIM, RS - BRASIL
MARÇO DE 2016

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE QUEIJO TIPO TOFU UTILIZANDO COAGULANTES VEGETAIS

JÉSSICA TAMIOZZO SCHMIDT

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI - Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

Orientadoras: Dr^a. Jamile Zeni

Dr^a. Juliana Steffens

ERECHIM, RS - BRASIL

MARÇO DE 2016

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE QUEIJO TIPO TOFU
UTILIZANDO COAGULANTES VEGETAIS**

Jéssica Tamiozzo Schmidt

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI - Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

Comissão Julgadora

Prof^a. Dr^a. Jamile Zeni
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Juliana Steffens
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Clarice Steffens
URI Erechim

Dr^a. Mercedes C. Carrão-Panizzi
Embrapa Trigo – Passo Fundo

Erechim, 10 de Março de 2016

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – ERECHIM.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da inteligência e da sabedoria e pela força, o discernimento e a paciência nos momentos difíceis.

Agradeço a minha família, aos meus pais João e Ana e minhas irmãs Giovana e Emanuele, por todo o amor, dedicação, carinho e apoio dedicados a mim, sempre com palavras e gestos de incentivo e motivação, mas principalmente pela paciência.

Agradeço as cats Adri, Aline, Keli, Re e Va por toda a amizade, companheirismo, ajuda, apoio, motivação e momentos de descontração dedicados a mim. Vocês meninas ajudaram a tornar tudo mais fácil e mais prazeroso, vou leva-las sempre em meu coração. Em especial a Keli e a Aline por toda a ajuda durante a execução do projeto.

Agradeço aqueles que me ajudaram direta ou indiretamente nos laboratórios de Biotecnologia, Termodinâmica, Análise Sensorial e Bromatologia, em especial a Sandi, que esteve sempre pronta e com um sorriso no rosto para me auxiliar no que fosse, a Rose e a Vera que com todo carinho me dedicaram ajuda nos momentos de dúvidas e de necessidade, a Débora e a Marci que sempre estiveram à disposição para qualquer dúvida e ajuda e a Ju que me auxiliou durante uma análise, abdicando do seu tempo para meu benefício.

Agradeço ao pessoal do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos pela ajuda, em especial as minhas orientadoras Jamile e Juliana por todos os ensinamentos, a dedicação, a paciência e os puxões de orelha, e as professoras Geciane e Clarice que sempre me auxiliaram nos momentos de questionamentos.

Agradeço ao Rodrigo Santos Leite pela realização das análises de isoflavonas realizadas na Embrapa Soja.

Agradeço a FAPERGS pela bolsa de estudos e à URI campus Erechim.

Cada um de vocês foi parte essencial para que esse projeto se tornasse realidade, do fundo do meu coração, meu sincero obrigada.

“Se você não está disposto a arriscar,
Esteja disposto a uma vida comum”.

Jim Rohn

Resumo da dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE QUEIJO TIPO TOFU UTILIZANDO COAGULANTES VEGETAIS

Jéssica Tamiozzo Schmidt
Março/2016

Orientadores: Dr^a. Jamile Zeni
Dr^a. Juliana Steffens

O tofu é um queijo de origem vegetal, oriundo da soja, obtido através da coagulação do extrato hidrossolúvel de soja (EHS) por diferentes coagulantes. A utilização de coagulantes vegetais para o processamento do tofu, faz com que este produto possa ser consumido por pessoas do grupo alimentar vegano. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar um queijo tipo tofu a partir de EHS com diferentes coagulantes vegetais de kiwi, limão e gengibre. A soja utilizada para o processamento do tofu, proveniente de cultivares convencionais, foi macerada por 16 h para obtenção do EHS. Os extratos vegetais de kiwi, gengibre e limão foram utilizados como coagulantes vegetais, sendo analisado o valor de pH e a atividade de protease dos mesmos. O tofu I foi obtido a partir da coagulação do EHS aquecido e coagulado em pH 3,4 com temperatura de 40°C para o extrato de kiwi, pH 6,6 com temperatura de 65°C para o extrato de gengibre e pH 2,5 com temperatura de 80°C para o extrato de limão. O tofu I de kiwi e gengibre apresentou aspecto mais homogêneo, com massa líquida e o de limão um aspecto mais granular, com massa firme. A partir das características visuais obtidas do processamento do tofu I, foi analisado a influência do pH e da temperatura dos coagulantes vegetais na coagulação do EHS, obtendo-se para a coagulação do tofu II o valor de pH 2,0 com temperatura de 80°C para os três coagulantes vegetais, onde o tofu II de kiwi, gengibre e limão apresentou aspecto visual mais granular, com massa firme. Para os grãos de soja foram realizadas as análises de umidade, proteína bruta, lipídios, cinzas, pH, minerais, ISN, IPD, determinação e quantificação de isoflavonas, determinação colorimétrica da presença/ausência da enzima lipoxigenase e atividade do inibidor de tripsina Kunitz. Para o EHS, além das análises realizadas para os grãos de soja, foram realizadas as análises de acidez e sólidos solúveis. No tofu I e II foram realizadas as análises de rendimento, índice de sinérese, umidade, cinzas, pH, proteína, acidez titulável, cor, contagem total de bactérias psicrófilas, coliformes totais e termo tolerantes, no 1° e no 7° dia de armazenamento. Os tofus I e II não apresentaram diferenças significativas para a acidez, pH e proteína do 1° para o 7° dia de armazenamento. Os rendimentos do tofu I de kiwi e gengibre foram maiores do que os rendimentos dos demais, apresentando também os maiores índices de sinérese. As análises microbiológicas ficaram dentro dos padrões da legislação para coliformes totais e termo tolerantes, ausentes para contagem total de bactérias psicrófilas, para o tofu I e II de kiwi, gengibre e limão. Os resultados deste trabalho mostram que os coagulantes de kiwi,

gingibre e limão podem ser utilizados para a elaboração de tofus e as melhores condições para a obtenção foram de pH 2,0 e temperatura de coagulação de 80°C, obtendo-se um tofu com massa mais firme e granular para os três coagulantes analisados.

Palavras-chave: Tofu, Extrato hidrossolúvel de soja, Soja, Coagulante vegetal, Vegano.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering.

DEVELOPMENT AND CHEESE CHARACTERIZATION TOFU TYPE USING VEGETABLES COAGULANTS

Jéssica Tamiozzo Schmidt

March/2016

Advisors: Dr^a. Jamile Zeni

Dr^a. Juliana Steffens

Tofu is obtained by coagulation of soybean soluble extract (EHS) by different coagulants. The use of vegetable coagulants for tofu processing, makes this product a vegan food group. The objective of this study was to develop and characterize a cheese type tofu from EHS with vegetable coagulant of kiwi, lemon and ginger. Soybeans used for tofu processing, were of conventional cultivars, whose grains were macerated for 16 h to obtain the EHS. The vegetable extracts of kiwi, lemon and ginger plants were used as coagulants, and pH and protease activity were analyzed. First, with proper pH of the referenced statements and temperatures as great for coagulation, the tofu I was obtained from the clotting EHS heated and coagulated at pH 3,4 (40°C) for kiwi extract, pH 6,6 (65°C) for ginger extract and pH 2,5 (80°C) for lemon extract. The tofu I kiwi and ginger presented more homogeneous appearance, with net mass and lemon tofu I presented a more granular appearance, with stiff dough. From the visual characteristics, in the tofu I processing, it was examined the influence of pH and temperature of the vegetable coagulants in the coagulation of EHS. Yielding of tofu II coagulated at pH 2,0 with 80°C temperature for the three vegetables coagulants, where the tofu II kiwi, ginger and lemon features more granular visual appearance, with stiff dough. For soybean grains were performed analyzes of moisture, protein, lipid, ash, pH, minerals, ISN, IPD determination and quantification of isoflavones, colorimetric determination of the presence/absence of lipoxygenase enzyme and the activity of the Kunitz trypsin inhibitor. For EHS, in addition to the analyzes performed for soybeans, acidity analysis, and soluble solids were made. Tofu I and II were carried out performance analysis, syneresis index, moisture, ash, pH, protein, acidity, color, total count of psychrophilic bacteria, total coliform and thermo tolerant on 1st and 7th day of storage. Tofu I and II showed no significant differences for acidity, pH and protein from the 1st to the 7th day of storage. The yield of tofu I of kiwi and ginger were higher than the income of others, also have the highest rates of syneresis. Microbiological analyzes were within the law standards for total coliforms and thermo tolerant to missing psychrophilic total count of bacteria, for tofu I and II of kiwi, lemon and ginger. The results of this work shows that the coagulants of kiwi, ginger and lemon can be used for the preparation of tofu and the best conditions for obtaining were pH 2,0 and coagulation temperature of 80°C, obtaining a pasta with tofu more firm and granular to the three analyzed coagulants.

Keywords: Tofu, Water-soluble extract of soybean, Soya bean, Vegetable coagulant, Vegan.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVO GERAL	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1. VEGANISMO	17
3.2. SOJA.....	19
3.3. EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA (EHS).....	22
3.4. TOFU	24
3.5. COAGULANTES VEGETAIS	28
3.5.1. Kiwi.....	29
3.5.2. Gengibre.....	31
3.5.3. Limão	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. SOJA.....	35
4.2. EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA (EHS).....	35
4.3. COAGULANTES VEGETAIS	37
4.3.1. Avaliação da influência do pH dos coagulantes de kiwi, limão e gengibre na coagulação do EHS.....	39
4.3.2. Avaliação da influência da temperatura na coagulação do EHS com kiwi, gengibre e limão.....	39
4.4. ELABORAÇÃO DO TOFU	40
4.4.1. Rendimento dos tofus.....	42
4.4.2. Índice de sinérese	43
4.5. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	43
4.5.1. Composição físico-química.....	43
4.5.2. Macro e micro minerais.....	45
4.5.3. Índice de solubilidade de nitrogênio	46
4.5.4. Índice de dispersibilidade proteica	46
4.5.5. Determinação e quantificação das isoflavonas.....	47
4.5.6. Determinação colorimétrica da presença/ausência da enzima lipoxigenase	48
4.5.7. Determinação do teor do inibidor de tripsina Kunitz	49

4.5.8.	Atividade de protease	51
4.5.9.	Determinação dos parâmetros de cor dos tofus	51
4.6.	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	52
4.6.1.	Contagem total de bactérias psicrófilas	52
4.6.2.	Coliformes totais e termo tolerantes	52
4.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1.	CARACTERIZAÇÃO DOS GRÃOS DE SOJA E DO EHS	54
5.1.1.	Análises físico-químicas dos grãos de soja e do EHS	54
5.1.2.	Conteúdo mineral	57
5.1.3.	Teor de isoflavonas	59
5.2.	PRESENÇA/AUSÊNCIA DAS ISOENZIMAS LIPOXIGENASES NOS GRÃOS E NO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA	60
5.3.	COAGULANTES VEGETAIS	62
5.3.1.	Análise de pH e atividade de protease	62
5.4.	PROCESSAMENTO DO TOFU	62
5.4.1.	Tofu I	62
5.4.1.1.	Análises físico-químicas tofu I	63
5.4.2.	Tofu II	65
	Avaliação das condições de pH para coagulação do EHS	66
	Avaliação das condições de temperatura para coagulação do EHS	68
	Elaboração do Tofu II	70
5.4.2.1.	Análises físico-químicas tofu II	70
5.4.3.	Análise de rendimento e índice de sinérese	72
5.4.4.	Avaliação instrumental de cor	73
5.5.	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	74
6.	CONCLUSÕES	76
6.1.	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	76
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma de processo de obtenção do tofu.....	25
Figura 2. Fluxograma da visão geral do trabalho.....	34
Figura 3. Fluxograma do processo de obtenção do extrato hidrossolúvel de soja.	36
Figura 4. Grãos de soja macerados em água destilada por 16 h (a) e extrato hidrossolúvel de soja (b).	37
Figura 5. Kiwi, rizomas de gengibre e limão in natura para obtenção dos extratos coagulantes vegetais.	37
Figura 6. Fluxograma do processamento de obtenção dos extratos coagulantes de kiwi, gengibre e limão.....	38
Figura 7. Extratos coagulantes vegetais de kiwi, limão e gengibre, respectivamente.....	39
Figura 8. Fluxograma do processamento de obtenção do tofu I.	41
Figura 9. Fluxograma do processamento de obtenção do tofu II.	42
Figura 10. Teste colorimétrico para determinar a presença e ausência das isoenzimas lipoxigenases (LOX) nos grãos de soja, no extrato hidrossolúvel de soja sem aquecimento (EHS) e no extrato hidrossolúvel de soja aquecido (EHS aquecido).	61
Figura 11. Tofu I de kiwi, gengibre e limão, respectivamente, elaborados em condições de pH natural dos extratos vegetais (kiwi ~ 4,0, gengibre ~ 6,0 e limão ~ 2,0) e temperatura de coagulação de 40°C para kiwi, 65°C para gengibre e 80°C para limão, coagulados por 40 min.	63
Figura 12. Coagulação do extrato hidrossolúvel de soja com coagulante vegetal de limão, gengibre e kiwi, em pH 2,0, 4,0 e 6,0 e temperatura de 80°C, 65°C e 40°C, respectivamente.	67
Figura 13. Coagulação do EHS com coagulante vegetal de limão, kiwi e gengibre em temperaturas de 40°C, 65°C e 80°C em pH 2,0, respectivamente.....	69
Figura 14. Tofu II de kiwi, gengibre e limão, coagulados com pH 2,0 e temperatura de 80°C.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de umidade e extrato seco dos grãos de soja, do extrato hidrossolúvel de soja, do tofu I de kiwi, gengibre e limão no 1º e no 7º dia de armazenamento e do tofu II de kiwi, gengibre e limão no 1º e no 7º dia de armazenamento.....	44
Tabela 2. Conteúdo de cinzas, lipídios, proteína bruta, IDP, ISN, inibidor de tripsina e pH nos grãos de soja e no extrato hidrossolúvel de soja.....	55
Tabela 3. Composição mineral dos grãos de soja e no extrato hidrossolúvel de soja.....	58
Tabela 4. Teor de isoflavonas nos grãos de soja e no extrato hidrossolúvel de soja.....	59
Tabela 5. Valores de pH e atividade de protease dos coagulantes vegetais de kiwi, gengibre e limão.....	62
Tabela 6. Conteúdo de cinzas, acidez, pH e proteína bruta do tofu I de kiwi, gengibre e limão no 1º e no 7º dia de armazenamento.....	64
Tabela 7. Valores ajustados de pH dos coagulantes vegetais de kiwi, gengibre e limão.....	66
Tabela 8. Conteúdo de cinzas, acidez, pH e proteína bruta do 1º e do 7º dia de armazenamento das amostras de tofu II (kiwi, gengibre e limão).....	71
Tabela 9. Resultados de rendimento e índice de sinérese para o tofu I e o tofu II de kiwi, gengibre e limão.....	72
Tabela 10. Análise instrumental da cor do tofu I e do tofu II de kiwi, gengibre e limão, entre o 1º e o 7º dia de armazenamento.....	73
Tabela 11. Análises microbiológicas de coliformes totais e termo tolerantes e de contagem total de bactérias psicrófilas no tofu I e no tofu II de kiwi, gengibre e limão, entre o 1º e o 7º dia de armazenamento.....	74

1. INTRODUÇÃO

Ao longo da história, o vegetarianismo mesclou-se com a cultura em todo o mundo, sua disseminação foi lenta, mas crescente. Fatores racionais, emocionais e a saúde são algumas razões para essa adoção da dieta (COUCEIRO; SLYWITCH e LENZ, 2008). A partir do modo de vida vegetariano, surge o veganismo, estilo de vida que recusa o consumo de animais e produtos que derivem deles, além de preconizar o boicote ao consumo em várias esferas de produtos que gerem morte ou maus tratos a animais (ABONIZIO, 2013).

Neste contexto de dietas padronizadas na alimentação humana, surge o emprego da soja, com seus valores nutricionais e funcionais, alegação de benefícios à saúde, através de um sistema moderno de produção de alimentos, com diversificação de produtos à base de soja de melhor qualidade nos mercados (BOATTO et al., 2010; AZEVEDO, 2011; CARRÃO-PANIZZI e SILVA, 2011).

Dentro da variabilidade da soja, no campo da indústria de alimentos, é conhecido e comercializado o extrato hidrossolúvel de soja (EHS) ou leite de soja. Desse extrato, se produz o tofu, além de outros produtos (CIABOTTI et al., 2007).

O tofu, oriundo da China, está ganhando cada vez mais popularidade em todo o mundo. Considerado uma fonte valiosa de proteína em comparação com carne, peixe e queijo, torna-se importante para indivíduos veganos (LI et al., 2015). Possui sabor suave e textura porosa, é livre de colesterol, fonte de proteínas, minerais e ácidos graxos poli-insaturados (SERRAZANETTI et al., 2013).

O processo de fabricação do tofu envolve duas etapas principais. A primeira é a obtenção do extrato hidrossolúvel de soja, através da maceração e trituração dos grãos de soja e aquecimento do extrato hidrossolúvel de soja, onde será realizada a inativação térmica das enzimas lipoxigenases. A segunda é a coagulação do extrato hidrossolúvel de soja, etapa determinante para obtenção da textura e rendimento do tofu (KAMIZAKE; SILVA e PRUDENCIO, 2016). A coagulação do extrato hidrossolúvel de soja pode ser realizada a partir de coagulantes de origem animal, microbiano ou vegetal. Se tratando de indivíduos veganos, o uso de coagulantes de origem vegetal se torna uma opção.

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo, elaborar e caracterizar queijo tipo tofu utilizando coagulantes vegetais de kiwi, gengibre e limão.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolver e caracterizar um queijo tipo tofu a partir de extrato hidrossolúvel de soja com diferentes coagulantes vegetais.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Caracterizar físico-quimicamente os grãos de soja:
 - Verificar o teor de umidade, cinzas, pH, minerais (Mn, K, Cu, Zn, Mg e Ca), lipídios e proteína bruta;
 - Analisar as proteínas solúveis (índice de dispersibilidade proteica – PDI e índice de solubilidade de nitrogênio – NSI);
 - Verificar a presença das enzimas lipoxigenases;
 - Extrair e quantificar as isoflavonas;
 - Avaliar a atividade do inibidor de tripsina Kunitz.
- ❖ Obter e caracterizar físico-quimicamente o extrato hidrossolúvel de soja:
 - Verificar o teor de umidade, cinzas, pH, minerais (Mn, K, Cu, Zn, Mg e Ca), lipídios, proteína bruta, acidez e sólidos solúveis;
 - Analisar as proteínas solúveis (índice de dispersibilidade proteica – PDI e índice de solubilidade de nitrogênio – NSI);
 - Verificar a presença e a ação do aquecimento na inativação das lipoxigenases;
 - Extrair e quantificar as isoflavonas;
 - Avaliar a atividade do inibidor de tripsina Kunitz.
- ❖ Obter e analisar os coagulantes vegetais de kiwi, limão e gengibre:
 - Verificar a atividade de protease e pH dos coagulantes vegetais.
- ❖ Elaborar e caracterizar os tofus de kiwi, limão e gengibre em relação às características físico-químicas e microbiológicas:
 - Verificar o teor de umidade, cinzas, pH, acidez e proteína bruta;

- Avaliar o índice de sinérese, a cor e o rendimento dos tofus;
- Verificar a contagem total de bactérias psicrófilas e coliformes totais e termo tolerantes.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item será apresentado uma breve revisão bibliográfica sobre produtos veganos, a soja, o extrato hidrossolúvel de soja, o tofu e sobre coagulantes vegetais (kiwi, gengibre e limão).

3.1. VEGANISMO

A alimentação dos indivíduos é determinada por vários fatores que vão desde o acesso aos alimentos até as escolhas baseadas em valores culturais e crenças religiosas. Ao longo dos anos, as mudanças econômicas e sociais influenciaram o modo de vida e as práticas alimentares da humanidade (TEIXEIRA et al., 2006). A pluralidade da sociedade contemporânea nos atesta a existência de inúmeras dietas, como vegetarianismo, veganismo, frugivorismo, *fast food*, *junk food*, etc., onde os indivíduos constroem uma identidade de recusas e incentivos à ingestão de alimentos por diversas motivações, entre elas, médicas, sociais e éticas (ABONIZIO, 2013).

Os vegetarianos ou também conhecidos vegetarianos puros, são aqueles indivíduos que excluem de sua alimentação apenas os ingredientes de origem animal, como ovos, laticínios, mel, gelatina, etc (CENTRO VEGETARIANO, 2002).

O veganismo é um estilo de vida também conhecido como vegetarianismo radical. São indivíduos que se colocam contra qualquer modo de exploração animal, incluindo o seu consumo como fonte alimentícia, as formas de trabalho forçado, como componentes de produtos manufaturados (roupas, cosméticos, etc.) ou de processos, o uso em prol ao progresso da ciência e à vivissecção de animais em laboratórios e, também, qualquer forma de entretenimento que use da exposição e/ou maus-tratos (circos, rodeios, zoológicos, etc.) (TRIGUEIRO, 2013).

A origem do vegetarianismo vem dos primórdios da criação do homem e dentre os defensores e promotores, o primeiro no Oriente foi Pitágoras, considerado o “pai do vegetarianismo”. Durante a primeira metade do século XX, a disseminação do vegetarianismo ocorreu pelos ideais de reformadores da saúde e por aqueles que defendiam os princípios éticos de uma dieta vegetariana (MELINA; DAVIS e HARRISON, 1998).

Segundo Couceiro; Slywitch e Lenz (2008), as razões à adoção da dieta do vegetarianismo incluem:

- Saúde – a dieta vegetariana é mais saudável do que as dietas que incluem alimentos de origem animal;
- Ética e direitos dos animais – tirar a vida de outra criatura é fundamentalmente errado;
- Meio ambiente – uma forma de reduzir impactos ao meio ambiente;
- Economia – falta de recursos financeiros para poder comprar carne;
- Religião – crença de que matar é estritamente errado.

Nas últimas décadas, os avanços em pesquisa na área da nutrição evidenciam significativos benefícios para a saúde humana, contribuindo para o ressurgimento do interesse pelo vegetarianismo (SABATÉ, 2003).

A dieta do vegano baseia-se em um regime com cereais, frutas, leguminosas, hortaliças, tubérculos, sementes, cogumelos e algas, além de derivações destes produtos. De acordo com a American Dietetic Association (2003) e Sabaté (2003), se planejadas e equilibradas, as dietas vegetarianas são saudáveis e adequadas em termos nutricionais, trazendo benefícios para a prevenção e para o tratamento de determinadas doenças, contrapondo com as dietas baseadas em elevado consumo de produtos de origem animal.

Os indivíduos veganos se configuram como um novo público-alvo para grandes empresas que lhes direciona produtos alimentícios (ABONIZIO, 2013), porém, tais produtos também são consumidos por outras pessoas que evitam o consumo de animais, mas não possuem hábitos tão estritos (CENTRO VEGETARIANO, 2002).

Segundo Pereira (2014), os indivíduos que aderiram ao veganismo há mais anos, em Porto Alegre (RS), argumentam que o mercado de produtos veganos encontra-se em constante expansão, além de estar aumentando a quantidade de estabelecimentos adeptos ao movimento.

Em pesquisa empírica sobre a alimentação no Brasil, Barbosa (2007) fala que a base da alimentação da maioria dos brasileiros é o trio “arroz, feijão e carne”. No prato dos veganos, a soja, muitas vezes, entra no lugar da carne.

A soja é considerada a principal fonte de proteína vegetal da alimentação do homem e de animais em diversos países, quando comparada aos cereais e outras espécies de leguminosas, ela apresenta o maior conteúdo proteico (LIU, 1999; MANDARINO, 2008).

3.2. SOJA

A soja é uma semente oleaginosa pertencente à família Leguminosae (Fabaceae), à subfamília Faboideae (Papilionoidae) e ao gênero *Glycine* (MANDARINO, 2008). Começou a ser produzida há cerca de cinco mil anos pelos chineses que a consideravam um grão sagrado, assim como o arroz, o trigo, o centeio e o milheto (PAULETTO e FOGAÇA, 2012; EMBRAPA, 2014a).

Sua origem consta no Continente Asiático, na região da antiga Manchúria, atual China. Desta região, se expandiu para outras partes do Oriente, Japão e Coréia, depois para o Ocidente. Na América, foi cultivada nos Estados Unidos como planta forrageira e produtora de grãos. No Brasil, chegou inicialmente na Bahia e espalhou-se para São Paulo e Rio Grande do Sul, sendo cultivada até os dias atuais (PAIVA; ALVES e HELENO, 2006).

No Brasil, somente no final da década de 60, a cultivar de soja ganhou importância econômica, principalmente por se ajustar ao cultivo de verão após o cultivo do trigo, e pelo interesse das indústrias de óleo na produção de farelo de soja (EMBRAPA, 2014b).

Nos últimos 30 anos, no Brasil, a cultura de soja foi a que mais cresceu, com crescimento anual em produção no país de 2,43% até 2019 (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014). Diante disso, a soja é considerada uma das mais importantes *commodities* brasileira, em constante crescimento (CONAB, 2015).

O maior produtor mundial de soja é os Estados Unidos, com produção de 108,014 milhões de toneladas, seguido do Brasil, com produção de 95,070 milhões de toneladas. O maior produtor brasileiro é o estado de Mato Grosso, com produção de 27,868 milhões de toneladas e o terceiro maior produtor brasileiro é o estado do Rio Grande do Sul, com produção de 14,688 milhões de toneladas de soja (EMBRAPA, 2015).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2015), na estimativa para a safra de grãos 2015/2016 brasileira, a soja apresentará o maior crescimento absoluto, com estimativa de 110,9 milhões de toneladas. Esse resultado representa um aumento na produção em relação à safra 2014/2015 (96,2 milhões de toneladas).

A cultura da soja, responsável por mais de 56% da área cultivada do país, permanece como principal responsável pelo aumento de área, crescimento de 1,1% em relação à área cultivada na safra 2014/2015. A estimativa é de crescimento de 3,4% (1,1 milhão de hectares), alcançando 33,2 milhões de hectares na área cultivada com a oleaginosa (CONAB, 2015).

A consolidação da soja como importante fonte de proteína vegetal, geração e oferta de tecnologia para viabilidade e produção em diferentes regiões, proporcionaram um elevado crescimento para o cultivo da leguminosa, destacando-se entre as principais atividades econômicas do agronegócio mundial (HIRAKURI e LAZZAROTTO, 2011).

Nos Estados Unidos, os alimentos processados que contêm soja, disponíveis no mercado, contabilizam 60%. No Brasil, a porcentagem não é muito diferente e aumenta progressivamente, isso se deve aos resultados de pesquisas científicas com o apoio de estratégias de *marketing*, focando o consumidor especialmente preocupado com questões de saúde (AZEVEDO, 2011).

Atualmente, o emprego de soja está aumentando em decorrência da inclusão de dietas padronizadas na alimentação humana, definidas por parâmetros científicos e pela ótica do sistema moderno de produção de alimentos, da alegação de benefícios para a saúde humana, a seus valores nutricionais e funcionais, além do aumento e diversificação de produtos à base de soja de melhor qualidade nos mercados (BOATTO et al., 2010; AZEVEDO, 2011; CARRÃO-PANIZZI e SILVA, 2011).

O consumo de soja ou de seus derivados na dieta contribuem para uma melhor qualidade de vida, com redução da concentração sérica de colesterol e triglicerídeos, prevenindo doenças crônico-degenerativas e alguns tipos de cânceres (BOWLES e DEMIATE, 2006), osteoporose e atenuação dos sintomas da menopausa (PAULETO e FOGAÇA, 2012). Segundo a Food and Drug Administration – FDA (1999), o consumo diário de 25g de proteínas de soja, como parte da dieta, pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares.

A composição do grão de soja depende de vários fatores: tipo de cultivar, condições ambientais, época de plantio e localização geográfica (SILVA, 2009). Sua constituição é basicamente de 8% de casca, 90% de cotilédones e 2% de hipocótilo. Sua composição química é de 60% de peso seco do grão constituído de óleo e proteínas (20% de óleo e 40% de proteínas, geralmente), 35% de carboidratos e 5% de fibras (POYSA; WOODROW e YU, 2006). Há ainda no grão de soja uma quantidade considerável de lipídios (18-20%), sendo 85% de ácidos graxos insaturados e 15% ácidos graxos saturados; entre os insaturados se destacam os ácidos linoleico e linolênico que apresentam, através de sua consumação, baixas incidências de algumas doenças crônicas como as coronarianas (PENALVO et al., 2004). Dentre os carboidratos presentes na soja, glicose, frutose, sacarose, fibras e oligossacarídeos, a sacarose corresponde a aproximadamente 60% do total de açúcares solúveis e os oligossacarídeos rafinose e estaquiase representam 4 e 36%, respectivamente (HYMOWITZ et al., 1972).

As fibras estão presentes nas paredes das células da soja, conferindo firmeza e estrutura ao grão, sendo resistentes à absorção pelo intestino delgado de humanos, com fermentação completa ou parcial no intestino grosso. As fibras solúveis possuem capacidade de formar géis em solução aquosa e aumentam a viscosidade do bolo fecal (BRENNAN, 2005), as fibras insolúveis contribuem para o aumento do bolo fecal acelerando o trânsito intestinal, além de reduzirem a absorção de glicose e retardar a hidrólise do amido (CATALANI et al., 2003). Os grãos de soja contêm aproximadamente 5% de minerais, com predomínio de: magnésio, fósforo, cálcio, enxofre, cloretos e sódio, cujos teores estão na faixa de 0,2 a 2% (LIU, 1999; GONÇALVES et al., 2014).

Dos compostos constituintes da soja, destacam-se as isoflavonas, compostos fenólicos bioativos que podem reduzir o risco de alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares, osteoporose e diabetes (MANDARINO, 2010). O perfil das isoflavonas é variável, depende da cultivar, das formas de processamento e do tipo de produto (BARBOSA; LAJOLO e GENOVESE, 2006).

Apesar de suas propriedades nutricionais, funcionais e da alta produtividade, há uma certa resistência com os produtos de soja devido ao sabor e odor característicos, conhecidos como *beany flavor*, que desagradam o paladar ocidental (BOATTO et al., 2010). No entanto, nos últimos anos, tem ocorrido uma maior popularização do seu consumo entre os brasileiros, isso se deve a maior divulgação de seu valor nutricional e funcional e ao desenvolvimento de novas tecnologias para aprimorar suas características sensoriais, que incluem melhoramento genético da soja e medidas tecnológicas, como o tratamento térmico dos grãos para inativação de lipoxigenases como etapa inicial de qualquer processo (MANDARINO, 2008; BENASSI; VARÉA e PRUDENCIO, 2012).

Desta forma, o crescimento nas pesquisas com soja nos últimos anos aumentou seu uso pela indústria alimentícia, que tem aliado combinações com outras matérias-primas no desenvolvimento de novos produtos, originando alimentos com maior conteúdo proteico, aumentando a aceitação dos consumidores e reduzindo custos em relação aos produtos à base de soja (MUNHOZ et al., 2010; SERRAZANETTI et al., 2013).

Além da soja *in natura*, existem diversos produtos derivados da leguminosa, entre eles pode-se citar o extrato hidrossolúvel de soja e o tofu, que são alimentos não fermentados (NAKAJIMA et al., 2010; PAULETTO e FOGAÇA, 2012).

3.3. EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA (EHS)

O extrato hidrossolúvel de soja (EHS) é considerado um dos produtos derivados não fermentados mais conhecidos da soja. 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).

Popularmente conhecido como “leite de soja”, o EHS é um exemplo de substituto ao leite de vaca por ser desprovido de lactose, conter valores nutricionais e baixo custo de produção (PRUDENCIO e BENEDET, 1999; CARVALHO et al., 2011).

Os substitutos do leite de vaca são à base de plantas, extratos solúveis em água de leguminosas, oleaginosas, cereais ou pseudocereais que se assemelham na aparência. Estes extratos são utilizados em substituição do leite de vaca na dieta por um número crescente de consumidores por razões médicas (por exemplo, intolerância e alergia a lactose) ou como opção de vida (MÄKINEN et al., 2014).

De acordo com a Resolução CNNPA nº 14 de 28 de junho de 1978, o EHS pode ser definido 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 apresentar no máximo 93% de umidade e 0,6% de cinzas, no mínimo 3% de proteínas, 2,8% de carboidratos e 1% de lipídios (BRASILa, 1978).

De acordo com Poysa e Woodrow (2002), há várias maneiras de se preparar o EHS, tradicionalmente, ele é elaborado por imersão dos grãos de soja em água por algumas horas, etapa conhecida como maceração, seguida de drenagem, moagem com adição de água em determinada proporção e filtração para separação do líquido (EHS) do subproduto, conhecido como okara.

Durante um ou mais estágios do processamento para obtenção do EHS, a soja é submetida ao aquecimento, sendo a intensidade do tratamento térmico um fator interferente na solubilidade de suas proteínas, através da desnaturação irreversível da mesma (RODRIGUES; GOZZO e MORETTI, 2003; CIABOTTI et al., 2007; BENASSI e PRUDENCIO, 2013). Quando insolúveis, estas proteínas tendem a se agregar e sedimentar-se, produzindo textura indesejável em bebidas, conferindo sensação de arenosidade à boca e afetando os parâmetros reológicos do produto, como a viscosidade (RUSTOM; LÓPEZ-LEINA e NAIR, 1996).

Para eliminação do sabor e do odor característicos da soja no EHS, podem ser utilizados vários tratamentos, como a remoção completa da casca, a trituração com água quente, a

maceração dos grãos com álcalis ou ácidos e a adição de flavorizantes (MORAIS e SILVA, 1996; CASÉ et al., 2005).

O EHS é consumido tradicionalmente nos países asiáticos, enquanto que no ocidente ainda se encontra em fase de expansão. Inicialmente seu consumo era realizado por vegetarianos, indivíduos com restrições alimentares, ou de ordem religiosa e intolerantes à lactose (UILIANA e VENTURINI FILHO, 2010).

O consumo do EHS vem crescendo significativamente devido às suas qualidades como alimento de alto valor nutritivo e ao baixo custo de sua produção, despertando a atenção da indústria de alimentos, além de representar uma importante alternativa para a alimentação das populações desnutridas (GUERREIRO, 2006). Sua consumação pode se dar, tanto na forma natural (líquida), como na forma desidratada (pó), a qual possui vantagens de manuseio, conservação e transporte em relação à líquida (MORETTI e HINOJOSA, 1981).

O produto industrializado pode ser encontrado no Brasil 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 (GUERREIRO, 2006; BRANCO et al., 2007; ZAKIR e FREITAS, 2015). Com ampla aplicação na indústria de alimentos o EHS, líquido ou em pó, pode ser consumido adicionado a diversos produtos lácteos, como iogurtes, formulados infantis, sorvetes e cremes (NUNES et al., 2014).

No mercado nacional, é cada vez mais frequente a inclusão do EHS em sucos de frutas, o que indica 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).

O mercado de bebidas à base de soja cresce 30% ao ano no mundo e 35% no país, trata-se de um mercado de mais de R\$ 350 milhões (BRUNELLI e VENTURINI FILHO, 2012).

Sua composição química pode sofrer variações em virtude da variedade da matéria-prima utilizada e do processamento empregado, entretanto, o produto acabado deve apresentar teor proteico equivalente ao do leite de vaca (MORETTI e HINOJOSA, 1981; CASÉ et al., 2005).

Dos produtos derivados do EHS, um dos mais conhecidos é o tofu, e, na Ásia, cerca de 90% das proteínas da soja são consumidas na forma deste alimento (KIM et al., 2007).

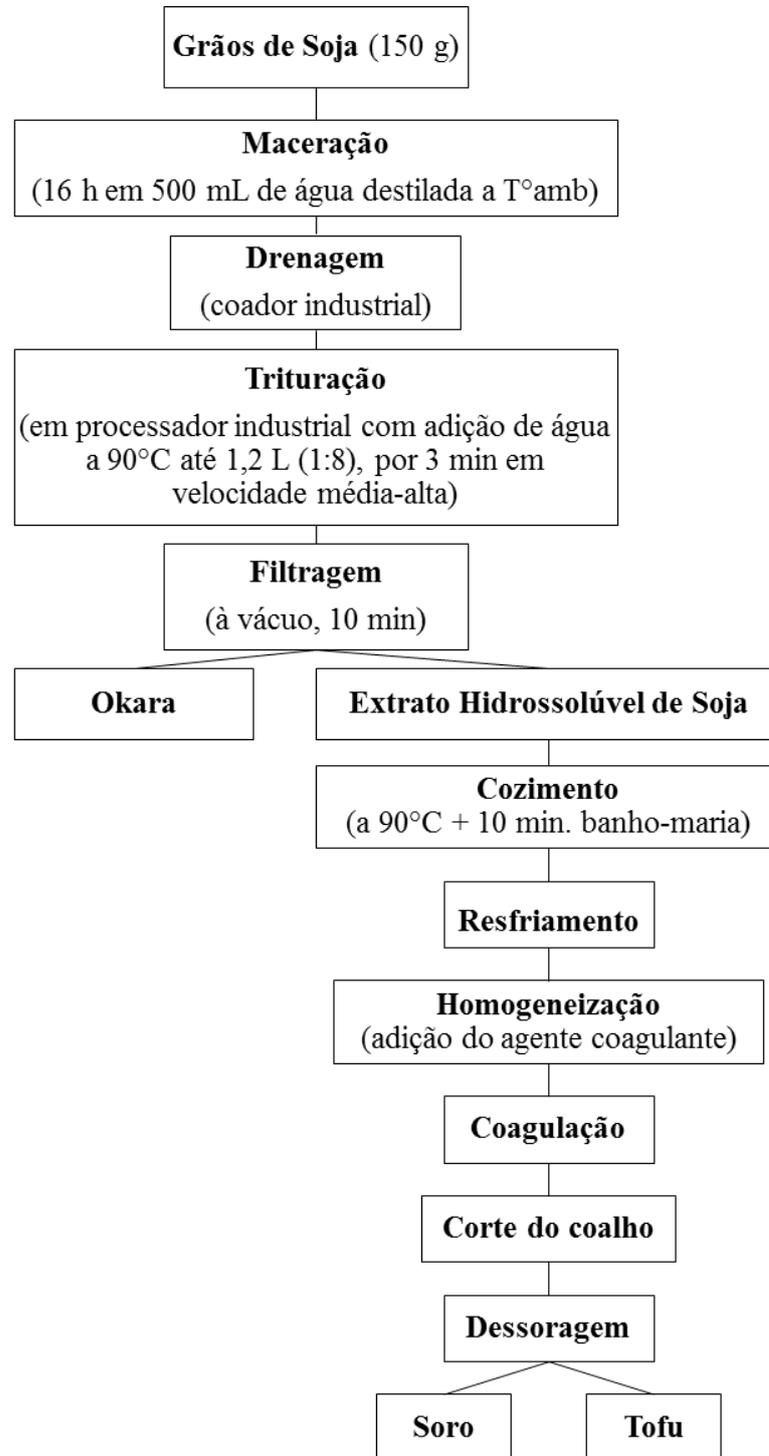
3.4. TOFU

O tofu é obtido a partir do EHS, produzido após a lavagem, maceração e trituração dos grãos de soja. Após a maceração, os grãos são moídos em água aquecida e são filtrados, separando o EHS do subproduto okara (Figura 1) (BENASSI; BENASSI e PRUDENCIO, 2011). A partir do EHS ocorre a precipitação das proteínas pelo calor, pela adição de coagulante, que podem ser sais ou ácidos, produzindo um gel resultante da formação de uma rede proteica com retenção de água, lipídios e outros constituintes, apresentando textura lisa, macia e elástica (CIABOTTI et al. 2007; CIABOTTI et al., 2009). 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 atual de reduzir a ingestão de produtos de origem animal (LI e HSIEH, 2004; POYSA; WOODROW e YU, 2006).

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).

Existem diferentes tipos de tofu no mercado, dependendo do tipo de coagulante e do teor de umidade, que podem ser classificados como: macio, firme e extra firme (LI 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 que a do *momen* é mais firme e menos uniforme, uma vez que o coágulo é quebrado e depois reformatado sob pressão (EVANS; TSUKAMOTO e NIELSEN, 1997; BENASSI e PRUDENCIO, 2013). De acordo com Li et al. (2013), o tipo de cultivar de soja, a qualidade do grão dependendo das condições de cultivo da planta, o armazenamento do grão e as condições de processamento do tofu influenciam o rendimento, textura e na qualidade do produto (CUI et al., 2004).

Figura 1. Fluxograma de processo de obtenção do tofu.



Fonte: adaptado de Benassi; Benassi e Prudencio (2011).

Além disso, a quantidade de água utilizada na obtenção do EHS afeta o teor de sólidos e a recuperação das proteínas e conseqüentemente a textura do tofu, assim como o EHS obtido, tipo e concentração do coagulante utilizado, pH, temperatura de gelificação e pressão aplicada

no gel (REKHA e VIJAYALAKSHMI, 2013). O rendimento do processo é muito importante do ponto de vista econômico, sendo expresso como a relação entre a massa de tofu produzida e a massa inicial de grãos, contudo, há uma grande diversidade de resultados, devido as diferentes condições utilizadas, seja em termos das cultivares de soja como dos parâmetros de processamento (BENASSI; YAMASHITA e PRUDENCIO, 2011).

De acordo com Min, Yu e St. Martin (2005), há influência do teor de proteínas do grão sobre o rendimento do tofu, sendo a determinação de proteínas no grão um meio para prever o rendimento e o conteúdo proteico do tofu. Para Benassi, Benassi e Prudencio (2011), o tamanho dos grãos de soja pode interferir no rendimento do tofu, onde grãos maiores tendem a aumentar o rendimento do tofu (CUI et al., 2004). Resultados observados por Ciabotti et al. (2009) mostram que quando se diminui a concentração do EHS, diminui-se o rendimento do produto, independente do coagulante utilizado, devido a quantidade de proteína presente no extrato de soja.

O tofu apresenta sabor quase neutro, logo, as propriedades de textura têm importante papel na qualidade e na aceitação do produto pelo consumidor (KAO et al., 2004). Sua textura se assemelha à de um queijo branco macio ou de um iogurte firme, deve ser lisa, firme e coesa (MIN; YU e ST. MARTIN, 2005). A partir dele, podem ser obtidos produtos secundários, como o tofu frito, grelhado, seco, congelado, fermentado, dentre outros, apresentando diferentes características sensoriais (LI et al., 2013).

A proteína é considerada o componente que mais influencia a textura do tofu (POYSA; WOODROW e YU, 2006) e a sua desnaturação térmica é um dos pré-requisitos para a formação do gel. Segundo Benassi e Prudencio (2013), o aquecimento do extrato de soja provoca o desdobramento das moléculas de proteínas e permite a exposição de grupos sulfidril, ligações dissulfeto e cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos. A adição do extrato coagulante permite interações entre as cadeias proteicas, resultando na formação de uma matriz com estrutura de rede tridimensional, responsável pelas características de textura do tofu (LIU et al., 2004).

A formação de gel no tofu compreende duas etapas: a desnaturação e a precipitação proteica, podendo ser por sais ou isoelétrica (KOHYAMA; SANO e DOI, 1995; BENASSI e PRUDENCIO, 2013). A desnaturação ocorre com início em um tratamento térmico que expõem as regiões hidrofóbicas das moléculas de proteína tornando sua carga líquida negativa. A precipitação por sais ocorre quando há formação de prótons que neutralizam a carga elétrica das proteínas, fazendo com que as interações proteína-proteína (interações hidrofóbicas) se

tornem mais fortes que as interações proteína-solvente. Portanto, as moléculas das proteínas sofrem agregação de forma aleatória e precipitam (KOHYAMA; SANO e DOI, 1995; LIU et al., 2004; BENASSI e PRUDENCIO, 2013). A precipitação isoelétrica envolve a diminuição da solubilidade das proteínas através da redução do pH, pela adição de ácidos, e decorrente aproximação ao ponto isoelétrico, que é o valor de pH no qual a solubilidade é a menor (MARZZOCO e TORRES, 2007)

A coagulação do EHS com o uso de coagulantes específicos é a etapa mais importante da produção do tofu e a mais difícil, pois depende da interação de alguns fatores: composição química da soja, volume processado, quantidade de sólidos, pH, tipo de coagulante e sua concentração, tempo e temperatura de coagulação e método de homogeneização (CIABOTTI et al., 2009). O aquecimento do EHS antes de se adicionar o extrato coagulante é muito importante, pois objetiva diminuir a carga microbiana, inativar compostos antinutricionais e desnaturar as proteínas. Essa desnaturação é imprescindível, pois faz com que a estrutura globular da proteína da soja se desdobre, expondo grupos funcionais, formando um gel de proteínas onde também são retidos os lipídios (BENASSI; YAMASHITA e PRUDENCIO, 2011).

Entre os coagulantes utilizados, há três principais: sulfato de cálcio (CaSO_4), Gluconato- δ -Lactona (GDL) e cloreto de magnésio (MgCl_2). A coagulação realizada com sulfato de cálcio ocorre de maneira lenta, o sulfato de cálcio possui baixa solubilidade e assim dissolve gradativamente, o tofu resultante apresenta característica macia, com boa capacidade de retenção de água (CRA). A coagulação com GDL é a coagulação ácida mais comum, ocorre através da indução pelo ácido glucônico, formado através da decomposição gradual do GDL, que possui maior solubilidade, fornecendo um rendimento mais elevado e maior capacidade de retenção de água, além de conferir um sabor azedo ao tofu. A coagulação com o cloreto de magnésio é difícil de controlar e faz com que o tofu fique rígido, não uniforme e com baixa retenção de água, contudo, o cloreto de magnésio foi o primeiro coagulante a ser utilizado no processamento de tofu, sendo o mais adequado para preservação do sabor natural da soja e obtenção de um tofu uniforme (LI et al., 2013).

Outros sais que podem ser utilizados são o sulfato de magnésio (MgSO_4 , conhecido como sal amargo), acetatos e lactatos, outros ácidos são o láctico e outros de grau alimentício, como vinagre e vários sucos cítricos, como o de limão (LIU, 1999).

Nos processos industriais, os coagulantes mais utilizados são o sulfato de cálcio (CaSO_4), cloreto de cálcio (CaCl_2), sulfato de magnésio (MgSO_4) e cloreto de magnésio (MgCl_2) (PRABHAKARAN; PERERA e VALIYAVEETIL, 2006).

Segundo Daniels et al. (2013), “cada coagulante confere ao tofu diferentes propriedades de textura e sabor, por isso esta é uma escolha importante”. O tipo e a qualidade do coagulante utilizado influenciam fortemente a textura e a microestrutura do coágulo de soja (KAO; SU e LEE, 2003) e de acordo com Li et al. (2013), afeta diretamente a característica do produto.

3.5. COAGULANTES VEGETAIS

A coagulação do EHS é uma etapa fundamental na elaboração de alguns tipos de produtos alimentícios, como o tofu, sendo geralmente realizada em presença de proteases coagulantes (EGITO e LAGUNA, 2006).

As proteases são proteínas encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de animais, vegetais e micro-organismos (RAO et al., 1998; SOARES et al., 2015). Elas são enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas e são classificadas em dois grandes grupos: exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases atuam próximo às extremidades das cadeias polipeptídicas, enquanto as endopeptidases atuam nas regiões internas das cadeias polipeptídicas (PALMA et al., 2002; GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011). As endopeptidases ou proteinases podem ainda ser divididas de acordo com seu mecanismo de ação em: cisteíno-, serino-, metalato- e asparato protease, onde o nome indica uma das regiões catalíticas no sítio ativo da enzima (WHITAKER, 1994; RAWLINGS; BARRETT e BATEMAN, 2010; GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011).

As proteases formam um dos grupos mais importantes de enzimas industriais, e uma de suas principais aplicações é a produção de queijo da indústria de laticínios (MERHEB-DINI et al., 2010).

A utilização de proteases vegetais como coagulantes é interessante uma vez que são enzimas naturais e seu uso para produção de queijos é adequado para consumidores vegetarianos (PINO et al., 2009). O número de enzimas de origem vegetal utilizadas industrialmente ainda é pequeno, apesar dos extratos das plantas serem usados em processos industriais por muito tempo (GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011).

Essas proteases podem ser obtidas a partir de fontes, como frutas (por exemplo, kiwi, limão, melão), raízes (por exemplo, rizomas de gengibre), látex (por exemplo, mamão, maçã) e flores (por exemplo, *Cynara cardunculus* e *Centaurea calcitrapa*) (FERNANDEZ-SALGUERO; TEJADA e GÓMEZ, 2002; ADETUNJI e SALAWU, 2008; DOMSALLA e MELZIG, 2008). Além disso, as propriedades funcionais que os extratos das proteases vegetais possuem são fundamentais para definir o sabor e a textura dos produtos, possibilitando aplicações inovadoras dessas proteases (MAZORRA-MANZANO et al., 2013).

Queijos elaborados com coagulantes vegetais são encontrados principalmente no Mediterrâneo, países da Europa Ocidental e do Sul Africano, contudo, na Espanha e em Portugal há a maior variedade e produção de queijos utilizando-se *Cynara sp.* como coagulante vegetal (ROSEIRO et al., 2003).

A proteólise intensa em queijos fabricados com coagulantes vegetais rompe a rede de caseína, originando uma estrutura mais homogênea, aumentando a cremosidade e o amolecimento do queijo (TEJADA; GÓMES e FERNÁNDEZ-SALGUERO, 2007). Porém, esta proteólise intensa gera também excesso de ácido, sabores amargos e diminui o rendimento dos queijos, desvantagens inerentes que limitam a utilização de coagulantes vegetais (ROSEIRO et al., 2003; LLORENTE et al., 2014).

O interesse científico em proteases vegetais e seu modo de ação em diferentes proteínas dos alimentos pode resultar em melhores produtos e também estimular o desenvolvimento de novas aplicações (MERHEB et al., 2007).

3.5.1. Kiwi

O kiwi (*Actinidia deliciosa*) é originário das regiões altas e úmidas do Vale do Rio Yang-Tzé, na China e chegou ao Brasil em 1971 através do Instituto Agrônomo de Campinas. (MATHIAS e SILVEIRA, 2012). O nome kiwi tem origem neozelandesa e deriva do nome de um pássaro típico daquela região, suas semelhanças são muitas, e por isso, essa foi uma forma de lançar o fruto no mercado no país e no exterior (ALBUQUERQUE, 2004). Pertence à família *Actinidiaceae* e se caracteriza por apresentar raízes carnosas, ramificadas e com tendência a distribuírem-se no substrato superior do solo. Quando jovem, seu caule é flexível e em ramos, à medida que a planta se torna adulta, seu caule se torna lenhoso e resistente (SAQUET e BRACKMAN, 1995).

O fruto do kiwi é uma baga de forma ovoide, esférica ou alongada, dependendo da cultivar. Possui película delgada, mas firme, coloração marrom e encoberta de pelos. Sua polpa apresenta coloração verde-esmeralda, as sementes são muito pequenas e dispostas radialmente com coloração pardo-escuras (FERGUSON e BOLLARD, 1990).

As cultivares mais plantadas e produtivas no mundo são de origem neozelandesa, as variedades produtoras são *Hayward*, *Monty*, *Allison*, *Bruno*, *Abbott*, *Jones*, *Geensil*, *Gracie* e *Elmwood* e as polinizadoras são *Matua*, *Tomuri* e *M-3* (ZUCCHERELLI e ZUCCHERELLI, 1987).

O fruto do kiwi é de grande interesse para consumo humano por ser rico em vitaminas e minerais, principalmente vitamina C, contendo o dobro que uma laranja, além de ser rico em betacaroteno e potássio (HEIFFIG et al., 2006). É considerado uma fruta cítrica, portanto contém antioxidantes que são importantes na diminuição da incidência de doenças cardiovasculares, degenerativas (câncer), disfunções cerebrais e inflamações (MACHADO et al., 2010).

Extratos de kiwis são utilizados na indústria alimentícia como amaciantes de carnes (HAN et al., 2009) e sucos concentrados de kiwi são extensivamente usados como ingredientes em muitos alimentos, como doces e geleias, xaropes, confeitaria e laticínios (GOULA e ADAMOPOULOS, 2011; GROZDANOVIC; BURAZER e GAVROVIC-JANKULOVIC, 2013).

A partir do kiwi pode-se obter a actinidina, uma cisteína protease com ampla atividade de pH e ampla especificidade de substratos (McDOWALL, 1970; BOLAND e HARDMAN, 1972; GROZDANOVIC; BURAZER e GAVROVIC-JANKULOVIC, 2013). A actinidina exibe a capacidade de formar coágulos no leite em que a caseína é separada longe das proteínas do soro do leite. A hidrólise realizada pela actinidina demonstra que o substrato preferido para esta enzima é a β -caseína, seguida por k-caseína, que é hidrolisada em um pequeno número de peptídeos maiores (LO PIERO; PUGLISI e PETRONE, 2011; GROZDANOVIC; BURAZER e GAVROVIC-JANKULOVIC, 2013).

Seu poder de coagulação foi avaliado por Lo Piero, Puglisi e Petrone (2011), onde observaram que a actinidina possui capacidade de formar coágulos no leite, sendo a enzima compatível com as condições de fabricação de queijos. Os produtos lácteos coagulados com actinidina, através de suco de kiwi, desenvolvem menos notas de aromas anormais, atribuídas a peptídeos amargos que ocorrem quando as proteases ficina (protease da papaína) são utilizadas nos mesmos produtos (SAHA e HAYASHI, 2001; GROZDANOVIC; BURAZER e

GAVROVIC-JANKULOVIC, 2013). Katsaros; Tavantzis e Taoukis (2010) relataram a aplicação tanto de pó de kiwi, rico em actinidina, quanto de suco de kiwi, para produção de produtos lácteos.

Contudo, o nível de atividade da actinidina no kiwi pode diferir dependendo da fase de crescimento dos frutos e do tratamento dos frutos pós-colheita ou durante o armazenamento (LAROCCA; ROSSANO e RICCIO, 2010).

3.5.2. Gengibre

O gengibre, *Zingiber officinale* Roscoe, pertence à família Zingiberaceae, com cerca de 47 gêneros e 1400 espécies, sendo que o gênero *Zingiber* compreende cerca de 150 espécies distribuídas principalmente em regiões tropicais e subtropicais da Ásia (RAVINDRAN e BABU, 2005). É uma planta herbácea perene, constituída por rizomas, as partes da planta mais utilizadas, que podem ser frescos ou secos (ALI et al., 2008). É caracterizado pelo seu típico sabor e aroma pungente, contendo altos níveis de oleoresinas, gingerol, óleos essenciais e conteúdo de fibras (KIZHAKKYIL e SASIKUMAR, 2009). Possui ampla atividade farmacológica, com atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, efeitos benéficos sobre doenças gastrointestinais, entre outros (ALI et al., 2008; BALIGA et al., 2011; BUTT e SULTAN, 2011).

O gengibre pode ser utilizado sob as formas: *in natura*, em conserva, cristalizado (NEGRELLE; ELPO e RUCKER, 2005), como óleo essencial usado na indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos (ALI et al., 2008) ou ainda seco (SALMON et al., 2012). Dentre os usos do gengibre na indústria de alimentos, as proteases presentes nos rizomas têm sido utilizadas como proteases coagulantes em produtos lácteos (HASHIM et al., 2011a).

No sul da China é produzido a “Jiang zhi ning ru”, uma sobremesa tradicional, produzida a mais de 100 anos pela mistura do suco de gengibre fresco com leite quente, onde o principal fator de produção é a atividade de coagulação do leite pela protease do gengibre (SU; HUANG e WANG, 2009; HASHIM et al., 2011b).

As proteases do rizoma do gengibre (GP) são cisteínas proteases (CHOI e LAURSEN, 2000) e foram isoladas pela primeira vez em duas formas denominadas protease de gengibre I (GP-I) e protease de gengibre II (GP-II) por Ichikawa, Sasa e Michi (1973). Ohtsuki et al (1995), mais tarde, separaram as proteases de gengibre em três frações e mostraram que elas possuem elevada atividade contra substratos de proteínas como: caseína, albumina de soro de bovino,

colágeno e gelatina (THOMPSON; WOLF e ALLEN, 1973; HASHIMOTO et al., 1991) e são inativadas por reagentes sulfidrilas (CHOI e LAURSEN, 2000) e, portanto, são agrupadas com outras cisteína proteases de plantas, como: papaína, ficina, bromelina e actinidina (HASHIM et al., 2011b; GAGAOUA; HOGGAS e HAFID, 2015).

3.5.3. Limão

O limão pertence ao gênero *Citrus* L. e à família *Rutacea*, a maioria das espécies de frutos cítricos provém da Ásia, em regiões compreendidas entre a Índia e o sudeste do Himalaia e são uma das mais importantes culturas de frutas do mundo (TRUCOM, 2004; MEHL et al., 2014).

O nome “limão” é comumente utilizado para indicar frutas cítricas ácidas que incluem os limões verdadeiros (*Citrus limon*) e as limas ácidas, entre elas a Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka), conhecida como limão Tahiti (WREGGE et al., 2006).

O limão Tahiti é um híbrido da lima-da-pérsia com o limão cravo, motivo pelo qual recebe o nome de lima ácida. Seu fruto é robusto, com formato arredondado, casca lisa ou ligeiramente rugosa, com coloração verde. A polpa tem coloração verde-clara, bastante succulenta, sabor menos ácido e sem a presença de sementes (TRUCOM, 2004).

As frutas cítricas contêm grande quantidade de suco com ricas fontes de fitoquímicos úteis, com grande quantidade de ácido cítrico, traços de ácido málico, muitos sais minerais e vitaminas A, C e E, flavonoides, cumarinas, carotenoides, além de pectina na entrecasca e óleos essenciais e antioxidantes na casca (TRUCOM, 2004). Estes fitoquímicos, quando consumidos através de frutas frescas ou de seus derivados, possuem uma variedade de funções biológicas para a saúde, incluindo antioxidante, antimutagênica, anticarcinogênica, anti-inflamatória e antienvelhecimento (RAJENDRAN et al., 2014; KE et al., 2015; ZHANG et al., 2015). As frutas cítricas têm sido utilizadas em diversos produtos, entre eles: sucos, vinhos, vinagres, geleias e conservas (ZOU et al., 2016).

Em produtos lácteos, a coagulação ácida das micelas de caseína envolve geralmente a fermentação do leite por meio de bactérias ácido lácticas para produção de queijo, isso é realizado através da conversão da lactose em ácido láctico. Uma alternativa para tal processo é a acidificação do leite utilizando-se um acidulante (GUINEE et al., 2002).

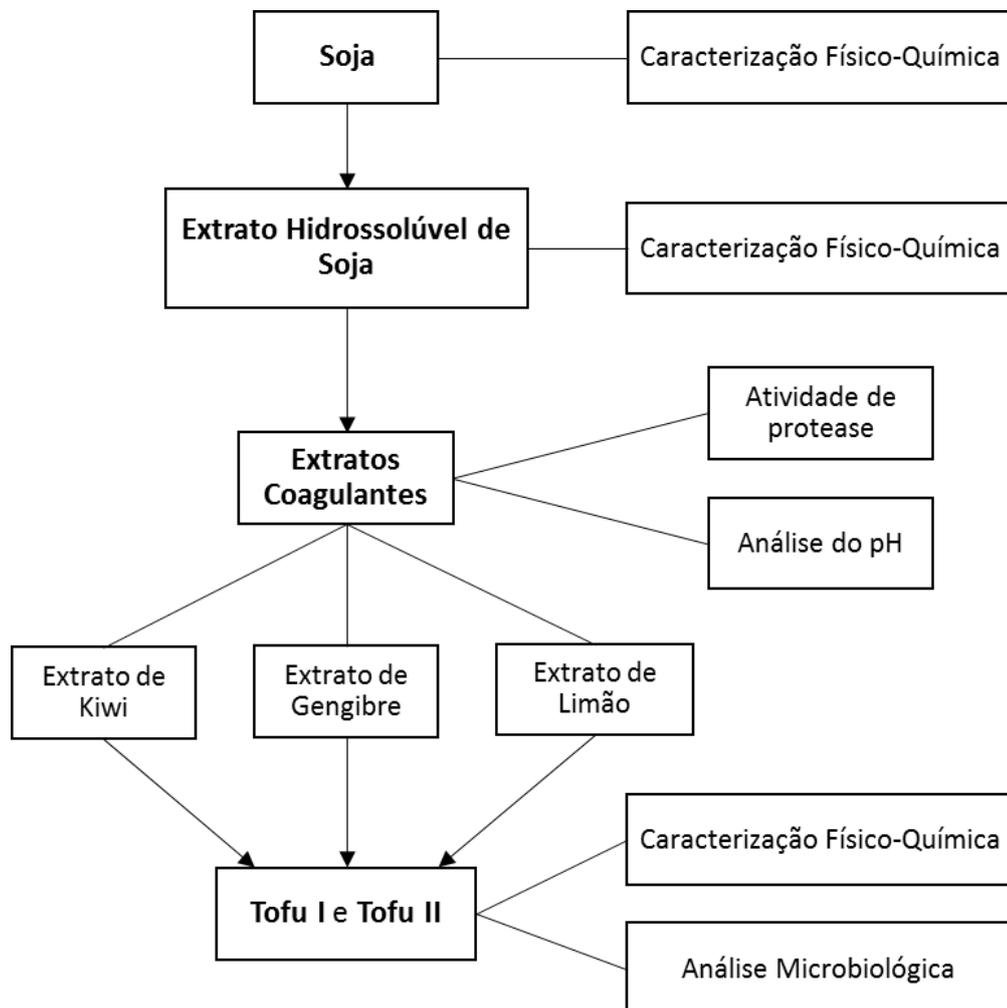
A coagulação ácida por meio de acidulantes é realizada a medida que o pH da solução diminui gradualmente, formando um gel homogêneo (NIK et al., 2011). Como o pH diminui,

as cargas superficiais das micelas de caseína são equilibradas, resultando no colapso da camada de k-caseína. Deste modo a estabilização estérica e eletrostática diminuem e as micelas de caseína coagulam para formar um gel (KRUIF, 1997).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste item serão apresentadas as descrições dos materiais e métodos utilizados para caracterização dos grãos de soja, caracterização e obtenção do EHS, obtenção e análise dos coagulantes vegetais de kiwi, limão e gengibre, obtenção e caracterização dos tofus de kiwi, limão e gengibre. A Figura 2 mostra a visão geral sobre o que será desenvolvido neste trabalho.

Figura 2. Fluxograma da visão geral do trabalho.



Fonte: autor.

4.1. SOJA

Os grãos de soja (*Glycine max* (L.)) utilizados neste estudo, foram cedidos pela Empresa Precisão Agro Comércio e Representações Ltda da cidade de Augusto Pestana - RS. Foram utilizados grãos provenientes de cultivares convencionais, categoria S1, oriundas da região de Augusto Pestana – RS (Latitude 28°31'01" S), safra 2013/2014.

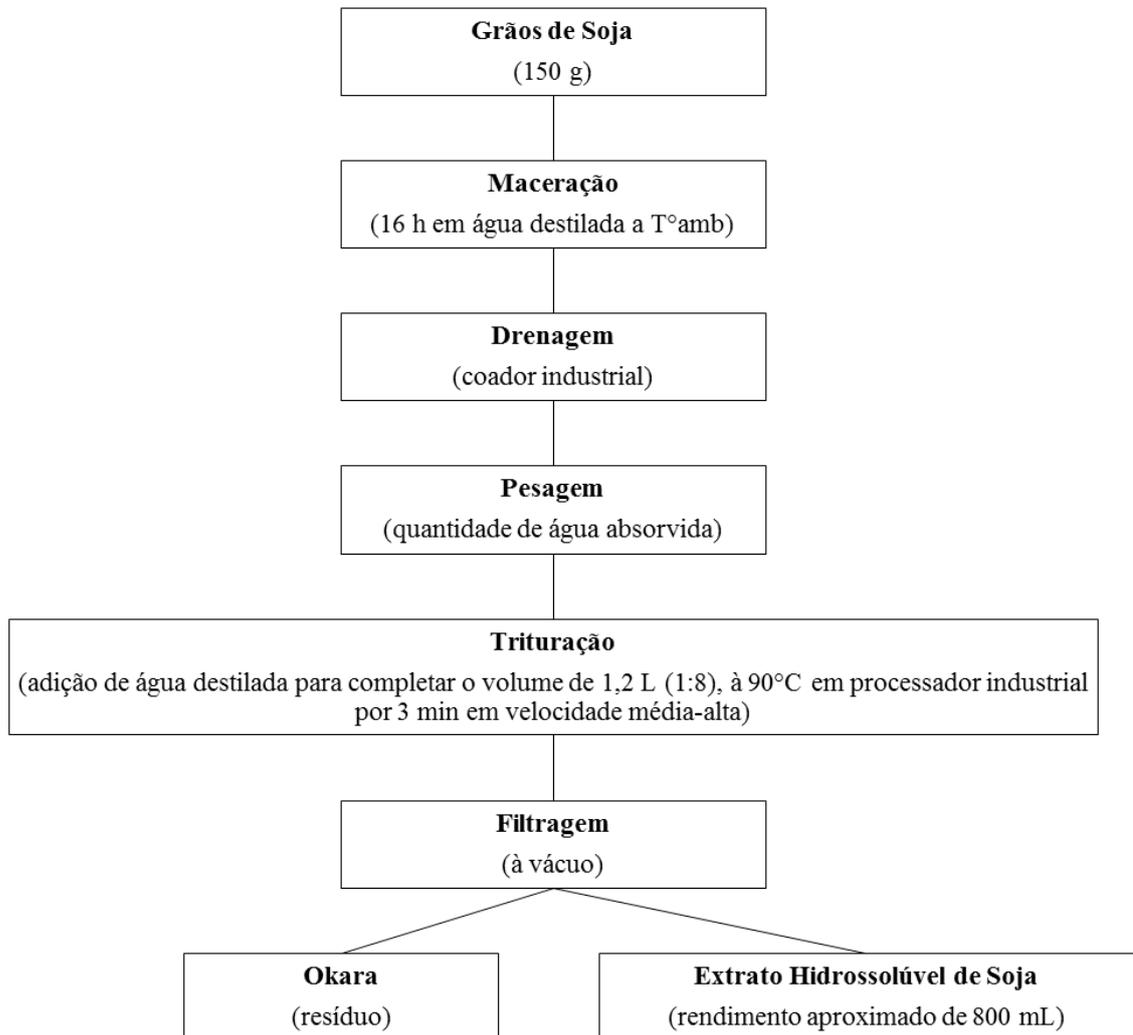
Os grãos foram moídos em moedor (Cuisinart®, modelo DCG-20BKN), peneirados em peneiras de 40 mesh (Bertel®) obtendo-se partículas menores que 420µm e então realizadas as análises de umidade, proteínas, lipídios, cinzas, pH, minerais, ISN, IPD, determinação e quantificação de isoflavonas, determinação colorimétrica da presença/ausência da enzima Lipoxigenase e atividade do inibidor de tripsina Kunitz, conforme descrito nos itens 4.5.1, 4.5.2, 4.5.3, 4.5.4, 4.5.5, 4.5.6 e 4.5.7, respectivamente.

Os grãos inteiros foram utilizados para obtenção do EHS.

4.2. EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA (EHS)

O EHS foi obtido pelo processamento dos grãos de soja, de acordo com metodologia adaptada de Benassi, Benassi e Prudencio (2011) (Figura 3). Primeiramente 150g de grãos de soja foram selecionados, classificados, pesados e lavados, depois foram deixados macerando (imerso) em 500 mL de água destilada, à temperatura ambiente, por 16 horas (Figura 4a). Posteriormente os grãos foram drenados e pesados para avaliar a água absorvida (g água/100 g grãos), conforme Equação 1. Em seguida, adicionou-se à soja água destilada à 90°C, considerando a água absorvida pelos grãos para que se completasse 1200 mL, com proporção final de 1:8 (grãos:água). Foi então realizada a trituração a quente em processador industrial (M. Vitroxy, modelo HP 1/2), durante 3 min, em velocidade média-alta. O EHS (Figura 4b) 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.

Figura 3. Fluxograma do processo de obtenção do extrato hidrossolúvel de soja.



Fonte: adaptado de Benassi, Benassi e Prudencio (2011).

$$\text{Absorção de água} = \text{massa grãos macerados} - \text{massa inicial grãos} \quad \text{Eq. (1)}$$

Figura 4. Grãos de soja macerados em água destilada por 16 h (a) e extrato hidrossolúvel de soja (b).



Fonte: autor.

No EHS foram realizadas as análises de umidade, proteínas, lipídeos pelo método de Gerber, cinzas, pH, acidez em graus Dornic, sólidos solúveis, minerais, ISN, IPD, determinação e quantificação de isoflavonas, determinação colorimétrica da presença/ausência da enzima Lipoxigenase e atividade do inibidor de tripsina Kunitz, conforme descrito nos itens 4.5.1, 4.5.2, 4.5.3, 4.5.4, 4.5.5, 4.5.6 e 4.5.7 respectivamente.

4.3. COAGULANTES VEGETAIS

O kiwi, os rizomas de gengibre e o limão foram obtidos na forma *in natura*, em um mercado local (Erechim/RS) (Figura 5).

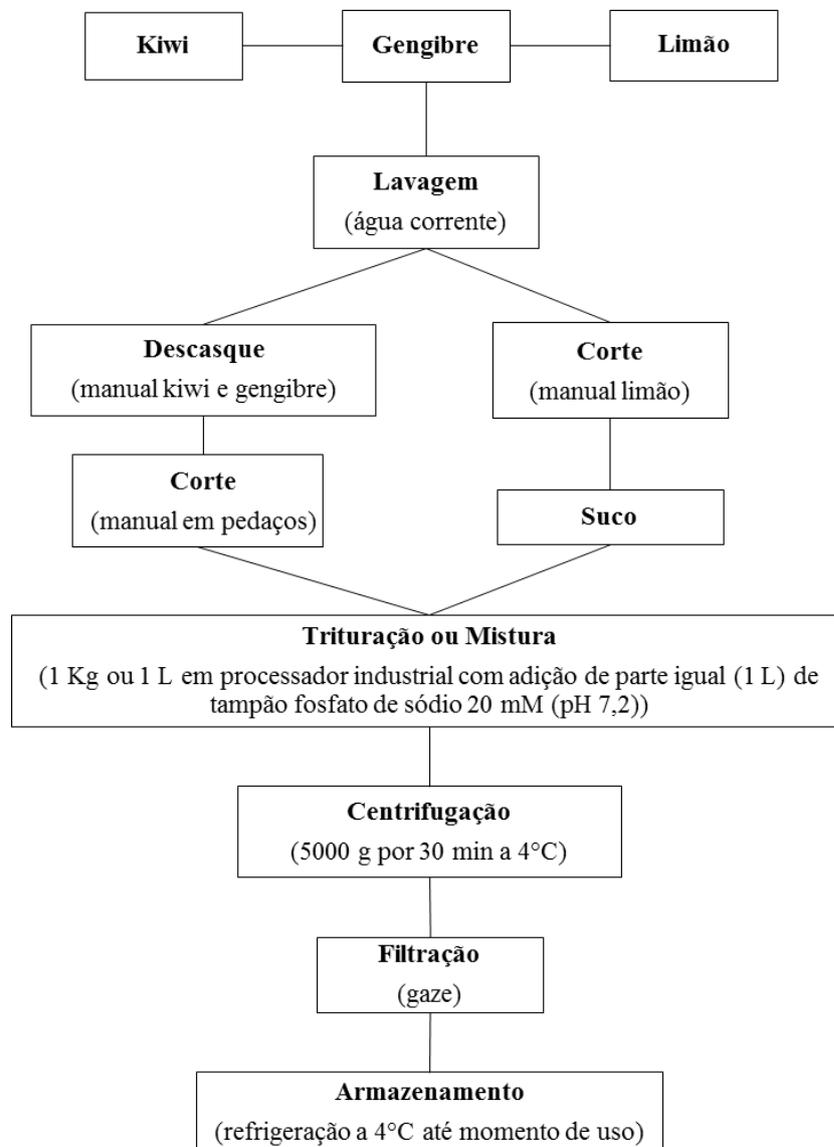
Figura 5. Kiwi, rizomas de gengibre e limão *in natura* para obtenção dos extratos coagulantes vegetais.



Fonte: autor.

Do kiwi e gengibre foram obtidos os extratos coagulantes de acordo com Mazorra-Manzano et al. (2013) e o extrato coagulante de limão de acordo com Adetunji et al. (2008), conforme mostrado na Figura 6. Os vegetais foram lavados, descascados (kiwi e gengibre), cortados e espremidos (limão), com posterior trituração ou mistura de 1 Kg de kiwi e gengibre e 1 L de limão em processador industrial (M. Vithory, modelo HP 1/2) com adição de parte igual de tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,2) (1:1 v/v). Após, foi realizada a centrifugação (Centrífuga MPW[®], modelo 351R) a 5000 g por 30 min a 4°C para posterior filtração à vácuo (Tecnal, modelo TE-058), com armazenamento a 4°C até o momento do uso (Figura 7).

Figura 6. Fluxograma do processamento de obtenção dos extratos coagulantes de kiwi, gengibre e limão.



Fonte: Mazorra-Manzano et al. (2013) e Adetunji et al. (2008).

Figura 7. Extratos coagulantes vegetais de kiwi, limão e gengibre, respectivamente.



Fonte: autor.

Nos coagulantes vegetais foram realizadas as análises de pH e atividade de protease, conforme descrito nos itens 4.5.1 e 4.5.8, respectivamente.

4.3.1. Avaliação da influência do pH dos coagulantes de kiwi, limão e gengibre na coagulação do EHS

O teste foi realizado analisando os coagulantes de kiwi, gengibre e limão em pH de 2,0, 4,0 e 6,0, ajustados com ácido cítrico 1M, lidos em pHmetro (Digimed, modelo DM-22). Após ajuste de pH, 1 mL do extrato coagulante e 0,03 mL de CaCl_2 40% foram adicionados a 10 mL do EHS. Foi observado visualmente o tempo necessário para coagulação e analisado qual o melhor pH testado para cada coagulante vegetal coagular o EHS.

4.3.2. Avaliação da influência da temperatura na coagulação do EHS com kiwi, gengibre e limão

Para avaliar o efeito da temperatura de coagulação, as condições ótimas de temperatura de 40°C para kiwi e 65°C para gengibre de acordo com Mazorra-Manzano et al. (2013), e de 80°C para limão de acordo com Adetunji et al. (2008), foram testadas para os três extratos coagulantes. Após banho-maria, foi deixado o EHS resfriar até atingir a temperatura desejada (40°C, 65°C ou 80°C), então em 10 mL de EHS adicionou-se 1 mL do extrato coagulante de kiwi, gengibre e limão em pH 2,0 e 0,03 mL de CaCl_2 40%. Foi observado visualmente o tempo

necessário para coagulação e analisado qual a melhor temperatura testada para cada coagulante vegetal coagular o EHS.

4.4. ELABORAÇÃO DO TOFU

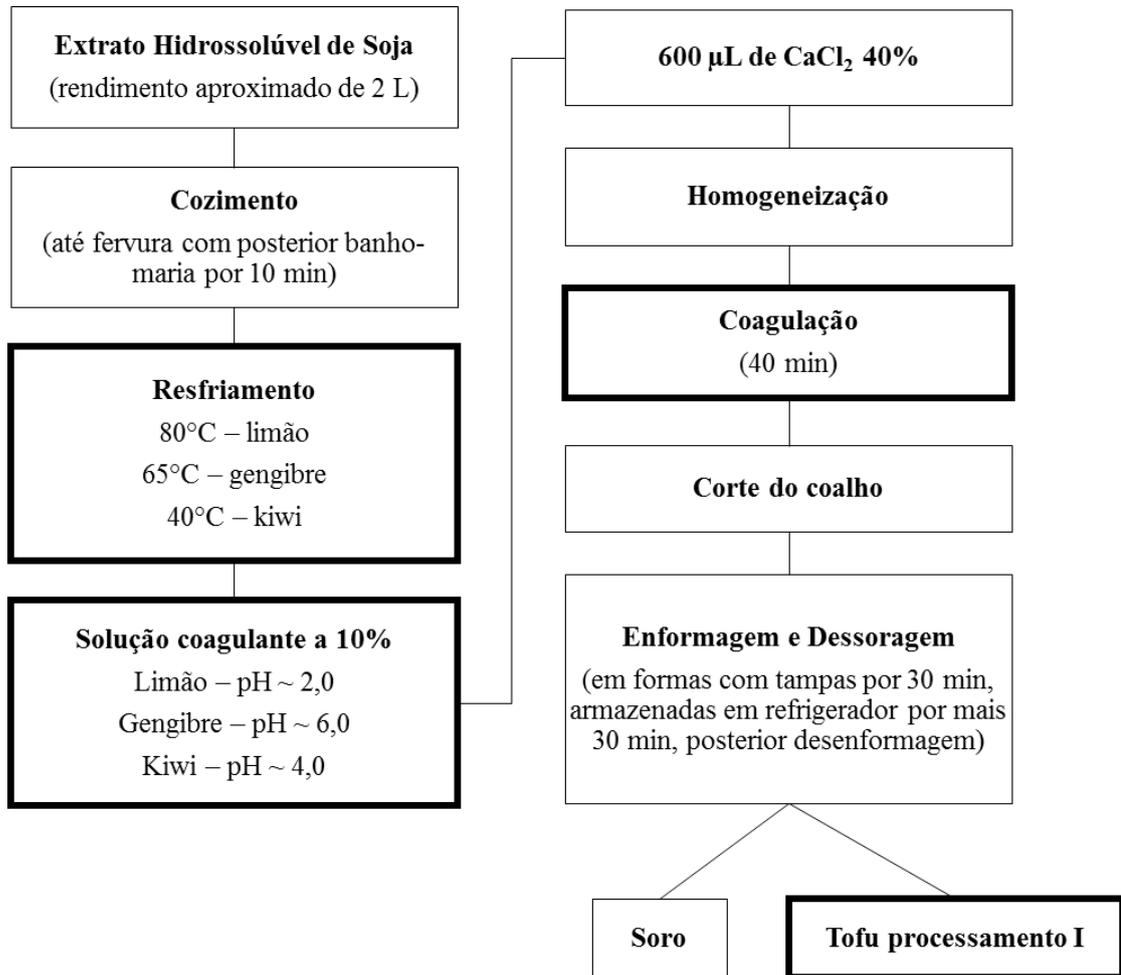
O tofu foi elaborado a partir da metodologia adaptada de Benassi, Benassi e Prudencio (2011), realizando-se três formulações a partir dos extratos vegetais de kiwi, gengibre e limão. Uma alíquota de 2 L do EHS foi tratada termicamente em recipiente coberto, sob fogo direto, até temperatura de 90°C, seguido de mais 10 min, em banho-maria em ebulição (Marconi®, modelo MA126).

Para o tofu I (Figura 8), após aquecimento, o EHS foi transferido para um recipiente de vidro e deixado arrefecer até a temperatura adequada de coagulação, 80°C, 65°C e 40°C para limão, gengibre e kiwi, respectivamente, de acordo com Adetunji et al. (2008) para limão e de acordo com Mazorra-Manzano et al. (2013) para kiwi e gengibre. Atingida a temperatura, foi adicionado 600 µL de CaCl₂ 40% e os coagulantes vegetais para cada formulação na concentração de 10% (Fasoyiro, 2014) com pH natural de cada extrato (kiwi ~ 4,0, gengibre ~ 6,0 e limão ~ 2,0), foi homogeneizado e deixado coagular por 40 min.

Para o tofu II (Figura 9), as condições foram definidas a partir dos resultados obtidos na avaliação da influência do pH (item 4.3.1) e temperatura (item 4.3.2) dos coagulantes vegetais para uma melhor coagulação do EHS, onde pH 2,0 e temperatura de 80°C foram as melhores condições de processo para os coagulantes vegetais de kiwi, gengibre e limão. Após aquecimento, o EHS foi transferido para um recipiente de vidro e deixado arrefecer até a temperatura de 80°C. Atingida a temperatura, foi adicionado o coagulante (limão, gengibre e kiwi) na concentração de 10% (Fasoyiro, 2014) e pH 2,0, e 600 µL de CaCl₂ 40%, seguido de homogeneização e coagulação por 25 min.

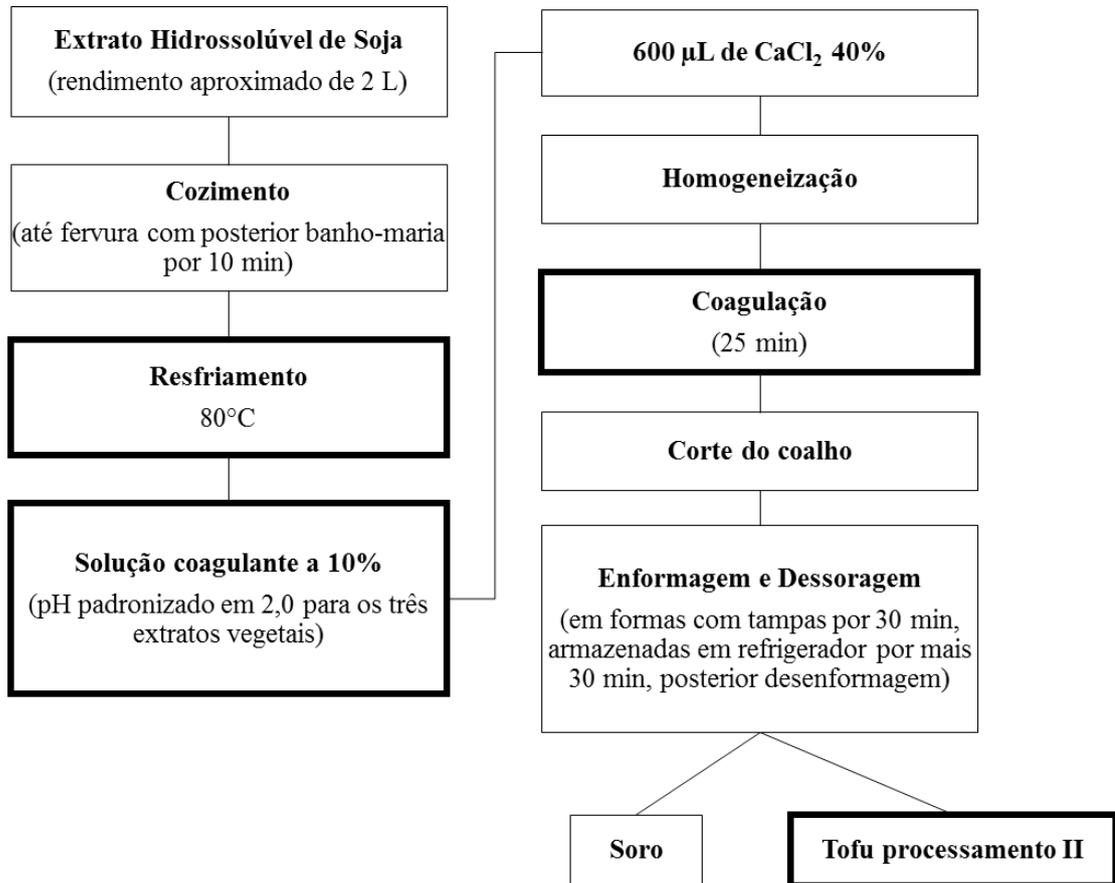
Após a coagulação, foi realizado o corte do coalho através de liras em dois movimentos transversais lentos. O coalho foi colocado em formas plásticas de aproximadamente 500 mL, perfuradas e forradas com “tunil”, por 30 min. Após retirada da forma, os tofus foram acondicionados em recipiente plástico fechado, sem adição de água e vácuo, em geladeira a temperatura de 4°C, até o momento das análises, durante 7 dias para avaliação do tempo de armazenamento.

Figura 8. Fluxograma do processamento de obtenção do tofu I.



Fonte: autor.

Figura 9. Fluxograma do processamento de obtenção do tofu II.



Fonte: autor.

Nos tofus obtidos foram realizadas as análises de rendimento, índice de sinérese, umidade, cinzas, pH, proteína, acidez titulável, cor, contagem total de bactérias psicrófilas e coliformes totais e termo tolerantes, conforme descrito nos itens 4.4.1, 4.4.2, 4.5.1, 4.5.9, 4.6.1 e 4.6.2, respectivamente. As análises foram realizadas no 1º e no 7º dia de armazenamento, com exceção da análise de rendimento, analisada somente no 1º dia de armazenamento. As análises de cinzas, pH, proteína e acidez titulável foram realizadas em base seca.

4.4.1. Rendimento dos tofus

O rendimento do tofu foi calculado de acordo com Benassi, Yamashita e Prudencio (2011), utilizando a Equação 2, 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 tofu/100g de grãos. Os resultados foram expressos em base úmida.

$$Tofu\ produzido = \frac{massa_{tofu}}{massa_{soja}} \times \frac{massa_{EHS}}{volume_{EHS}} \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

4.4.2. Índice de sinérese

A sinérese foi determinada nos tofus pelo método da drenagem, de acordo com Hassan et al. (1996), onde 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 pesado e a sinérese foi calculada de acordo com a Equação 3. Os resultados foram expressos em base úmida.

$$Sinérese\ (\%) = \frac{Peso\ do\ soro\ após\ filtração}{Peso\ da\ amostra} \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

4.5. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

As análises, todas em triplicata, foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Engenharia de Alimentos (Laboratórios de Análises Físico-Químicas e Bromatologia, Análise Sensorial, Biotecnologia de Alimentos e Processos de Separação/Termodinâmica), da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Erechim. Apenas as análises de extração e quantificação de isoflavonas foram realizadas na Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa da Soja localizada na cidade de Londrina no estado do Paraná.

4.5.1. Composição físico-química

Foram realizadas as análises de umidade, proteínas, lipídios, cinzas, pH, acidez e sólidos solúveis segundo os métodos do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985).

A umidade foi determinada pelo método por secagem em estufa (Fanem[®], modelo 320-SE) a 102 °C por aproximadamente 4 h (até peso constante). Os valores de umidade foram padronizados (Tabela 1) para as análises de proteína, lipídios, cinzas, acidez, sinérese e pH.

Tabela 1. Valores de umidade e extrato seco dos grãos de soja, do extrato hidrossolúvel de soja, do tofu I de kiwi, gengibre e limão no 1º e no 7º dia de armazenamento e do tofu II de kiwi, gengibre e limão no 1º e no 7º dia de armazenamento.

		Umidade (g/100g)	Extrato seco (g/100g)
Grãos de soja		7,81	92,19
Extrato hidrossolúvel de soja		92,30	7,70
1º dia de armazenamento			
Tofu I	Kiwi	7,98	92,02
	Gengibre	9,40	90,60
	Limão	12,75	87,25
Tofu II	Kiwi	18,19	81,81
	Gengibre	18,75	81,25
	Limão	18,74	81,26
7º dia de armazenamento			
Tofu I	Kiwi	11,16	88,84
	Gengibre	10,76	89,24
	Limão	16,50	83,50
Tofu II	Kiwi	17,60	82,40
	Gengibre	18,00	82,00
	Limão	19,38	80,62

Fonte: autor.

A determinação das proteínas foi realizada segundo método de Kjeldahl, para a quantificação de nitrogênio total, o conteúdo de proteína foi calculado multiplicando-se o resultado obtido pelo fator 6,25 para os grãos e para os tofus e 6,38 para o EHS.

A determinação de lipídios, para os grãos, foi realizada por extração em Soxhlet (Nova Ética[®], modelo NT340), utilizando éter de petróleo (Química Moderna[®] 30-60°C) como

extrator. Para o EHS foi realizada pelo método de Gerber, utilizando ácido sulfúrico (Synth) e álcool isoamílico (Synth) como extratores, com posterior centrifugação em centrífuga de Gerber (Brastec Laboratórios, modelo 6B) e leitura em butirômetro de Gerber (Laborglas Brasil).

As cinzas foram determinadas por meio da calcinação das amostras em mufla (Lavoisier[®], modelo 400C) a 550 °C por 6 h. Os resultados foram expressos em g/100g, em base seca.

A leitura do pH para os grãos (triturados em água destilada), EHS e os tofus (dissolvidos em água destilada) foi realizada em pHmetro (Digimed, modelo DM-22).

A acidez para o EHS foi determinada em graus Dornic através da titulação com hidróxido de sódio N/9, já para os tofus a acidez foi através da titulação com hidróxido de sódio 0,1 N (acidez titulável).

Os sólidos solúveis foram determinados por refratometria utilizando-se refratômetro de Abbé (Marca Bel[®] Equipamentos Ltda), corrigido para 20°C para o EHS, resultados expressos em °Brix.

4.5.2. Macro e micro minerais

Para a quantificação dos minerais Mn, K, Cu, Zn, Mg e Ca presentes nos grãos de soja e no EHS foi utilizado o método de espectrometria de absorção atômica com chama – FAAS (Varian, modelo SpectrAA 55) com prévia digestão das amostras, de acordo com IAL (1985).

Para realização da análise 3 g da amostra dos grãos foram pesados em balança analítica (Marte, modelo AL 500) e 20 mL do EHS medidos em pipetas volumétricas, os cadinhos de porcelana foram calcinados em mufla (Lavoisier[®], modelo 400C) a 550°C por 6 h. As cinzas foram diluídas em ácido nítrico 1M e filtradas em papel filtro Whatmann quantitativo n° 5 para balão volumétrico de 50 mL até completar o volume.

Após o término da digestão, a amostra foi diluída e preparada para a análise por FAAS. Para obtenção da quantidade de minerais nos grãos e no EHS foram usadas as médias das triplicatas. Os resultados foram expressos em mg/100g em base seca.

4.5.3. Índice de solubilidade de nitrogênio

O índice de solubilidade de nitrogênio (ISN) foi determinado segundo o método descrito na AOCS – método oficial Ba 11-65 (1969), que se destaca por ser uma técnica de lenta agitação. Onde 5 g de amostra de grãos de soja e EHS foram diluídos em 200 mL de água destilada, agitados em banho-maria (Marconi[®], modelo MA126) a 110 g a 30°C por 2 horas. Após esse tempo o sobrenadante foi centrifugado (Centrífuga MPW[®], modelo 351R), por 10 min a 170 g, o filtrado obtido foi utilizado para a determinação de proteína bruta pelo método oficial (IAL, 1985), onde o ISN foi calculado pela relação das Equações 4 e 5:

$$NS = \frac{V \times N \times f \times 0,014 \times Vd \times 100}{P \times Va} \quad \text{Eq. (4)}$$

Onde:

NS = Nitrogênio solúvel (%);

V = Volume de ácido clorídrico (HCl) 0,1 N gasto na titulação (mL);

N = Normalidade do HCl 0,1 N;

f = fator do HCl;

Vd = Volume de diluição (mL);

P = Peso da amostra (g);

Va = Volume da alíquota (mL);

$$ISN = \frac{NS \times 100}{Nt} \quad \text{Eq. (5)}$$

Onde: Nt = Nitrogênio total (%);

4.5.4. Índice de dispersibilidade proteica

O índice de dispersibilidade proteica (IDP) foi determinado segundo o método descrito na AOCS – método oficial Ba 10-65 (1980), que se destaca por ser uma técnica de rápida agitação. Onde 10 g de amostra de grãos de soja e de EHS foram diluídos em 250 mL de água destilada, agitados em homogeneizador (Ultra-Turrax[®], modelo T18) a 5450 g por 10 min. O

sobrenadante foi centrifugado (centrífuga MPW[®], modelo 351R), por 10 min a 550 g, o filtrado obtido foi utilizado para a determinação de proteína bruta pelo método oficial (IAL, 1985), onde o IDP foi calculado pela relação das Equações 6 e 7:

$$PS = \frac{V \times N \times f \times 0,014 \times Vd \times F \times 100}{P \times Va} \quad \text{Eq. (6)}$$

Onde:

PS = Proteína solúvel (%);

V = Volume de HCl 0,1 N gasto na titulação (mL);

N = Normalidade do HCl 0,1 N;

f = fator do HCl;

Vd = Volume de diluição (mL);

P = Peso da amostra (g);

Va = Volume da alíquota (mL);

$$IDP = \frac{PS \times 100}{Pb} \quad \text{Eq. (7)}$$

Onde: Pb = Proteína bruta (%);

4.5.5. Determinação e quantificação das isoflavonas

A análise para determinar e quantificar o teor das isoflavonas nos grãos e no EHS foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Berhow (2002). A extração das isoflavonas foi conduzida conforme Carrão-Panizzi et al. (2002). Essa análise foi realizada na Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa da Soja em Londrina/PR.

As amostras foram desengorduradas com n-hexano (Química Moderna[®] - Pureza 98,5%) a frio, durante 16 h. Alíquotas de 100 mg de cada amostra foram transferidas para tubos (tipo Falcon) de 10 mL com tampa rosqueável com posterior adição de 4 mL da solução extratora (etanol a 70 % contendo 0,1 % de ácido acético). Os tubos foram tampados, homogeneizados e a extração realizada por uma hora a temperatura ambiente (25°C). Em intervalos de 15 min os tubos eram agitados com agitador de tubos tipo “vortex” (Phoenix[®], modelo AP 56). Após a extração, as amostras foram transferidas para tubos de centrifuga tipo

“Eppendorf” e mantidas em geladeira (4°C) para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Antes da análise, cada amostra foi centrifugada em micro centrífuga refrigerada (Eppendorf®, modelo 5417 R) por 4 minutos a 35.396 g a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi filtrado em filtros Millex - LH (0,45 µm). Para a injeção direta no cromatógrafo líquido foram utilizados 20 µL de cada amostra.

A separação e a quantificação das isoflavonas foram realizadas em coluna de fase reversa do tipo ODS C18 (YMC-Pack ODS-AM, S-5 µm, 120 Å, com diâmetro de 4,6 mm e 250 mm de comprimento), em cromatógrafo líquido (HPLC - WATERS, modelo 2690), com injetor automático de amostras. Para a separação das isoflavonas utilizou-se o sistema de gradiente linear binário tendo-se como fases móveis metanol grau cromatográfico contendo 0,025% de ácido TFA (ácido trifluoroacético) (solvente A) e água destilada deionizada ultrapura contendo 0,025% de ácido TFA (solvente B). A condição inicial do gradiente foi de 20% para o solvente A, atingindo-se 90% em 35 min e retornando a 20% novamente a 40 min. O tempo total de corrida foi de 50 min. A vazão da fase móvel foi de 1 mL/min e a temperatura durante a corrida mantida constante a 25°C.

Para a detecção das isoflavonas utilizou-se o detector de arranjo de diodos (Waters, modelo 996), ajustado para o comprimento de onda de 254 nm. A identificação das isoflavonas foi realizada pela mistura dos padrões de daidzina, daidzeína, genistina e genisteína (Sigma®) em metanol (Merc, grau HPLC) nas seguintes concentrações: 0,00625 mg/mL; 0,0125 mg/mL; 0,0250 mg/mL; 0,0500 mg/mL e 0,1000 mg/mL.

A quantificação das isoflavonas por padronização externa (área dos picos) foi realizada utilizando-se as referências dos padrões. Todos os resultados foram expressos em mg/100g, em base seca.

4.5.6. Determinação colorimétrica da presença/ausência da enzima lipoxigenase

O teste colorimétrico para determinação da atividade das isoenzimas lipoxigenases foi realizado de acordo com Suda et al. (1995) e Kikuchi (2001), baseado na atividade de descoloramento das isoenzimas Lox sobre o substrato ácido linoléico e co-oxidação com o azul de metileno (LOX-1 e LOX-2) e β-caroteno (LOX-3), a partir de produtos formados pela reação

enzima-substrato com formação de radicais peroxil que interagem com os indicadores azul de metileno e β -caroteno, ocorrendo descolorimento.

A solução substrato linoleato de sódio foi preparada, conforme a metodologia descrita por Axerold et al. (1981), por meio da homogeneização, com auxílio de espátula de plástico, de 70 mg do ácido linoléico (Safc[®] - Pureza 99%), 70 mg de Tween 20 (Synth) e 4 mL de água destilada livre de oxigênio obtida em banho de ultrassom (Unique[®], modelo USC-1800A) sob vácuo por 20 min. Para o clareamento da solução, adicionou-se vagarosamente NaOH 0,1 M. A solução foi transferida para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com água destilada livre de oxigênio. O balão foi envolvido com papel alumínio e armazenado sob refrigeração a 4°C até o momento do uso.

Para a determinação colorimétrica das lipoxigenases preparou-se as soluções L1 e L3. A solução L1 foi preparada em um frasco âmbar com 25 mL de tampão borato de sódio 0,2 M, 5 mL de substrato linoleato de sódio 10 mM, 5 mL de água destilada ultrasonificada e 5 mL de azul de metileno 100 mM (Synth). Já a solução L3, também preparada em um frasco âmbar, continha 12,5 mL de tampão fostato de sódio 0,2 M, 5 mL do substrato linoleato de sódio 10 mM, 17,5 mL de água destilada ultrasonificada e 5 mL da solução de β -caroteno a 50% (Sigma[®] - Pureza 95%) de saturação em acetona (Vetec - Pureza 99,5%).

Para as análises das atividades das isoenzimas foram misturadas, em placa de toque em porcelana, 2,5 mg de amostra de soja ou uma gota do EHS ou uma gota do EHS aquecido, 30 μ L de solução de extrato de kanto 102 (1mg/mL), 250 μ L da solução L3 e 250 μ L da solução L1. A reação foi realizada em quatro repetições para cada amostra.

A presença ou ausência das enzimas lipoxigenases foi determinada pela coloração, sendo incolor para presença das três lipoxigenases; amarela para ausência da isoenzima LOX 3; azul para ausência das enzimas LOX 1 e LOX 2; e verde para ausência das três isoenzimas (LOX 1, LOX 2 e LOX 3). Não houve necessidade de analisar a isoenzima LOX 2, uma vez que o locus L1 encontra-se ligado ao locus L2.

4.5.7. Determinação do teor do inibidor de tripsina Kunitz

O teor do inibidor de tripsina Kunitz foi determinado conforme metodologia desenvolvida por Kakade et al. (1974). Primeiramente as amostras de soja foram moídas em moedor (Cuisinart[®], modelo DCG-20BKN) e o EHS foi liofilizado em liofilizador (Edwards@,

modelo Modulyo) e desengorduradas com n-hexano (Química Moderna[®] - Pureza 98,5%) sob agitação em agitador magnético (Velp Científica[®]) durante 16 h. A extração dos inibidores foi feita em agitação, durante três horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C) com 1g da amostra desengordurada em 50 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,01N. Após a etapa de extração, ajustou-se o pH da suspensão para 9,2 com HCl 1N e uma alíquota de 2 mL desta solução extratora foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL completando-se o volume com água destilada.

O teor inibitório foi realizado 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. Em cada tubo, previamente acondicionado em banho-maria (Marconi[®], modelo MA126) à 37°C, 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 cloreto de cálcio dihidratado -CaCl₂.2H₂O, marca Neon de pureza 99,0-105,0%), previamente aquecidos a 37°C, prosseguindo a incubação por mais 10 min. Após este período a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido acético 30% (v/v) da marca Dinâmica (pureza 99,7%), em todos os tubos. E a adição de 2 mL da solução de tripsina no tubo do branco. A suspensão foi então filtrada em papel Whatman n° 3 e o filtrado utilizado para determinação da atividade dos inibidores de tripsina em absorbância de 410 nm em espectrofotômetro (Spectro Vision[®], modelo DB-1880S).

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

$$\text{mg IT/g} = \frac{\text{Abs padrão} - \text{Abs amostra}}{38 \times \text{peso da amostra}} \times 2500 \quad \text{Eq. (8)}$$

4.5.8. Atividade de protease

A atividade de proteases dos coagulantes vegetais de kiwi, gengibre e limão foi avaliada através da hidrólise de azocaseína (CHARNEY; TOMARELLI, 1947). A solução substrato de azocaseína a 0,5% (p/v) foi preparada em tampão acetato 50 mM, pH 5,00. A 1 mL do substrato, adicionou-se 1 mL de extrato enzimático 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% p/v) com o objetivo de precipitar as moléculas de proteína não hidrolisadas pelas proteases. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 1.358,4 g, por 15 min.

Após centrifugação, 2 mL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo ao qual foi adicionado 2 mL de KOH 5N. 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 foi realizado através da Equação 9.

$$Atividade = \frac{ABS_{amostra} - ABS_{branco}}{(0,01) * \Delta t * V_A} \quad \text{Eq. (9)}$$

Onde:

$ABS_{amostra}$ = Valor da absorbância lida para a amostra do extrato enzimático;

ABS_{branco} = Valor da absorbância lida para o branco da análise;

Δt = Tempo decorrido da análise (min);

V_A = Volume de amostra usada (mL).

4.5.9. Determinação dos parâmetros de cor dos tofus

Foram determinados os parâmetros de cor L^* (luminosidade) que varia de 0 a 100, onde o 0 é o preto total e o 100 é o branco total, tendência da cor para a tonalidade vermelha (a^{*+}), tendência a cor para a tonalidade verde (a^{*-}), tendência da cor para a tonalidade amarela (b^{*+}) e a tendência da cor para a tonalidade azul (b^{*-}). As cores dos tofus foram determinadas utilizando colorímetro (Minolta Co. Japan®, modelo CR-400). O colorímetro foi disposto diretamente sobre a superfície dos tofus tomando-se três medidas de cor.

4.6. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises, todas em triplicata, foram realizadas no 1º e no 7º dia de armazenamento, nos laboratórios do Departamento de Engenharia de Alimentos (Laboratórios de Biotecnologia de Alimentos), da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Erechim.

4.6.1. Contagem total de bactérias psicrófilas

A análise de contagem total de bactérias psicrófilas foi realizada pelo método de plaqueamento em profundidade de acordo com metodologia da American Public Health Association (APHA, 2001). Utilizou-se o meio de cultura Ágar padrão para contagem (Merc), com incubação a 7°C por 10 dias, com diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Os resultados foram expressos em presença ou ausência de UFC/g.

4.6.2. Coliformes totais e termo tolerantes

A análise de coliformes totais e termo tolerantes foi realizada de acordo com Brasil (b 2003) pela semeadura de três séries de tubos, contendo 9 mL de caldo Lauril sulfato triptose (Merc) e tubo de Durhan invertido, com 1 mL de diferentes diluições da amostra. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 a 48 h para verificar a formação de gás e turvação do meio, indicando presença destes microrganismos. Os tubos positivos, com formação de gás, foram semeados em tubos contendo o meio *Escherichia coli* (EC) (Merc), mantidos em banho-maria (Marconi®, modelo MA126) a 44,5°C por 24 a 48 h para verificação da formação de gás. O NMP de coliformes fecais/g de amostra foi calculado pelo número de tubos positivos confirmados.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das amostras dos grãos, do EHS, dos coagulantes vegetais e dos tofus foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguidos de teste de Tukey para

comparação entre as médias dos resultados, a nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), utilizando o *software Statistica 8.0*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados os resultados e as discussões das análises realizadas nos grãos, no extrato hidrossolúvel de soja, nos coagulantes vegetais e nos tofus I e II de kiwi, gengibre e limão.

5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS GRÃOS DE SOJA E DO EHS

5.1.1. Análises físico-químicas dos grãos de soja e do EHS

Na Tabela 2 são apresentados os resultados das análises físico-químicas dos grãos de soja e do EHS. O conteúdo médio de cinzas para os grãos de soja (Tabela 2) foi de 4,89 g/100g, valores próximos foram encontrados por Rigo et al. (2015) para as cultivares de soja BRS 267, BRS 257 e Vmax (cultivar de soja convencional), com casca e sem branqueamento. Valores similares também foram observados por Gonçalves et al. (2014) nas cultivares BRS 284 (4,60 g/100g) e BMX Potência RR (4,79 g/100g), por Brunelli e Venturini Filho (2012) na cultivar BRS 213 (4,57 g/100g) e na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (UNICAMP, 2011), com 5,10 g/100g.

Os teores de lipídios dos grãos de soja (20,86 g/100g) foram próximos aos encontrados por Alezandro et al. (2008) para a cultivar BRS 243 RR (21,00 g/100g). Estes valores foram superiores aos encontrados por Rigo et al. (2015) em diferentes cultivares de soja, com um conteúdo médio de 14,66 g/100g de lipídios e na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (UNICAMP, 2011), com 14,60 g/100g. Benassi et al. (2011), avaliando o potencial de diferentes cultivares de soja para elaboração de tofu, verificaram um teor de lipídios de 20,19 g/100g para a cultivar BRS 257 e 18,55 g/100g para a cultivar BRS 267. De acordo com Carrão-Panizzi e Mandarino (1998), a diferença nos conteúdos lipídicos entre as cultivares de soja é comum, visto que os teores de lipídios nos grãos de germoplasma de soja variam entre 13 e 25%.

Tabela 2. Conteúdo de cinzas, lipídios, proteína bruta, IDP, ISN, inibidor de tripsina e pH nos grãos de soja e no extrato hidrossolúvel de soja.

Análise	Grãos de Soja	Extrato Hidrossolúvel de Soja
Cinzas (g/100g)	4,89 ($\pm 0,07$)	0,17 ($\pm 0,06$)
Lipídios (g/100g)	20,86 ($\pm 1,78$)	1,49 ($\pm 0,08$)
Proteína bruta (g/100g)	33,97 ($\pm 0,22$)	3,45 ($\pm 0,12$)
IDP (g/100g)	87,59 ($\pm 2,64$)	69,92 ($\pm 3,14$)
ISN (g/100g)	65,29 ($\pm 3,15$)	56,13 ($\pm 5,80$)
Inibidor de tripsina	13,90 ($\pm 0,59$)	8,03 ($\pm 0,12$)
pH	6,6 ($\pm 0,01$)	6,3 ($\pm 0,07$)
Acidez ($^{\circ}$Dornic)	na	13,65 ($\pm 1,42$)
Sólidos solúveis ($^{\circ}$Brix)	na	4,43 ($\pm 0,16$)

Média (três repetições) \pm Desvio Padrão.

Onde: IDP = índice de dispersibilidade proteica; ISN = índice de solubilidade de nitrogênio; na = não analisado.

Fonte: autor.

O conteúdo proteico dos grãos de soja (33,97 g/100g) se aproximou do valor encontrado por Gonçalves et al. (2014) para a cultivar BRS 284 (33,24 g/100g) e BMX Potência RR (34,74 g/100g). Ciabotti et al. (2006) obtiveram valores de 32,67 g/100g para a cultivar comum e Alezandro et al. (2008) de 35,90 g/100g para a cultivar BRS 243 RR. Nos estudos de Rigo et al. (2015), o menor o valor de conteúdo proteico foi de 34,79 g/100g e o maior valor foi de 38,77 g/100g para grãos com casca.

O valor do IDP (87,59 g/100g) dos grãos de soja foi maior que o obtido por Rigo et al. (2015) na média das cultivares Vmax (cultivar de soja convencional), BRS 267 e BRS 257, sem branqueamento e com casca de 82,55 g/100g dos mesmos autores.

O valor do ISN (65,29 g/100g) dos grãos de soja foi próximo ao encontrado por Rigo et al. (2015) para a cultivar BRS 267 sem branqueamento e com casca (63,58 g/100g) e maior para a cultivar BRS 257 sem branqueamento e com casca (62,30 g/100g). Segundo Rigo et al. (2015) os valores de IDP e de ISN são utilizados como guia para saber sobre a funcionalidade da proteína, onde quanto maior a solubilidade, menor o grau de desnaturação da proteína.

O teor do inibidor de tripsina Kunitz (13,90 mgIT/g) foi menor que o obtido por Rigo et al. (2015) para as cultivares sem branqueamento e com casca BRS 267 (16,57 mgIT/g), BRS

257 (20,50 mgIT/g) e Vmax (19,13 mgIT/g), e também do obtido por Galão et al. (2014) para a cultivar BRS 267 (15,76 mgIT/g) e BRS 257 (18,04 mgIT/g).

O valor de pH (6,6) para os grãos de soja está acima do obtido por 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 forma geral, a diferença entre os valores deste trabalho e os observados na literatura, podem ser atribuídas às diferenças genéticas entre as cultivares de soja, ao estágio de desenvolvimento em que os grãos foram colhidos e as condições de tempo e temperatura (SILVA, 2009).

Ao analisar os resultados do EHS em relação ao conteúdo médio de cinzas (Tabela 2), foi observado um valor de 0,17 g/100g aproximando-se aos reportados por Marin et al. (2014) com 0,13 g/100g, e Rodrigues e Moretti (2008) com 0,23 g/100g para o extrato de soja. Valor acima do obtido neste trabalho foi encontrado por Carvalho et al. (2011) com teor de cinza de 0,84 g/100g, e na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (UNICAMP, 2011) com 0,5 g/100g, para EHS. Em comparação aos grãos de soja analisados neste trabalho (Tabela 2), o valor obtido de cinzas para o EHS foi menor, isto pode ser em virtude da adição de água para obtenção do EHS e da separação do okara.

Os teores de lipídios do EHS (1,49 g/100g) deste trabalho foram similares aos obtidos por Marin et al. (2014) (2,2 g/100g), Brunelli e Venturini Filho (2012) (1,46 g/100g) e na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (UNICAMP, 2011) (1,6 g/100g). Carvalho et al. (2011) encontraram valor menor do que o obtido neste trabalho, com 1,05 g/100g de lipídios.

O conteúdo proteico do EHS (3,45 g/100g) está dentro dos padrões estabelecidos da Resolução RDC nº 268 de 22 de setembro de 2005 (BRASILc, 2005), que exige um teor de proteínas de no mínimo 3 g/100g. Ciabotti et al. (2006) encontraram valor de 3,56 g/100g ao analisar o EHS obtido de soja comum. Valores abaixo do apresentado neste trabalho foram obtidos por Marin et al. (2014) (1,7 g/100g), por Carvalho et al. (2011) (2,51 g/100g) e na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (UNICAMP, 2011) (2,4 g/100g). Em relação aos grãos de soja analisados neste trabalho (Tabela 2), o conteúdo proteico do EHS foi inferior, pois as proteínas são facilmente desnaturadas pelo calor que, como consequência, altera a conformação das moléculas, dificultando a ocorrência de ligações mais sustentáveis da rede proteica (KWORK; MACDOUGALL; NIRANJAM, 1999; CIABOTTI et al., 2007), e também pela diluição ao adicionar água para obtenção do EHS e pela separação do okara.

Os valores de IDP e ISN para o EHS foram de 69,92 g/100g e 56,13 g/100g respectivamente, sendo menores que os obtidos para os grãos de soja (Tabela 2), isto ocorre em

virtude do aquecimento aplicado para a obtenção do EHS. Essa diminuição da solubilidade pode se dar ao fato de que a área superficial dos grãos triturados é maior, facilitando assim a desnaturação da proteína pela ação do calor (RIGO et al., 2015). De modo geral, a solubilidade proteica diminui devido ao fato da ocorrência de desnaturação das proteínas da soja, porque há aumento dos grupos hidrofóbicos em sua superfície. Geralmente, temperaturas acima de 40°C provocam a desnaturação da maioria das proteínas, implicando em perda de sua solubilidade (ORDÓÑES et al., 2005).

O teor do inibidor de tripsina Kunitz no EHS (8,03 g/100g) apresentou uma redução de 42,23% em comparação com o teor apresentado nos grãos de soja (Tabela 2). Essa redução pode ser justificada pela aplicação do aquecimento (90°C por 3 min), juntamente com a trituração dos grãos, na etapa de obtenção do EHS com o aumento da área superficial dos grãos (RIGO et al., 2015). Sendo que esta diminuição nos valores de inibição de tripsina pode melhorar a digestibilidade da proteína (BRUNE et al., 2010).

O valor de pH (6,3) obtido para o EHS se aproximou do encontrado por Carvalho et al. (2011) com 6,7, diferente do obtido por Marin et al. (2014) com 4,4. De acordo com Lambrech et al. (1996), a faixa ideal de pH para a extração de proteínas destinadas à produção de tofu está entre 6,4 e 6,6, valor próximo ao obtido neste trabalho.

A acidez do EHS foi de 13,65°Dornic (0,136% ácido láctico), próxima a encontrada por Martins et al. (2013) que foi de 0,1 e 0,2% ácido láctico. Marin et al. (2014) observaram acidez de 0,46% de ácido láctico.

O valor dos sólidos solúveis (4,43°Brix) foi próximo ao encontrado por Rodrigues e Moretti (2008) que obtiveram 5,29°Brix, mas inferior aos encontrados por Marin et al. (2014), Martins et al. (2013) e Carvalho et al. (2011) com valores de 11,50, 12,00 e de 13,00°Brix, respectivamente.

5.1.2. Conteúdo mineral

Os resultados da composição mineral dos grãos de soja e do EHS são apresentados na Tabela 3. Observa-se que o mineral presente em maior quantidade foi o K (984,03 mg/100g), da mesma forma como foi verificado por Rigo et al. (2015) e Benassi e Prudencio (2013). Segundo Amaral (1981) e Oliveira (1981), a soja se destaca pelo elevado teor de K, que concorre para a manutenção do equilíbrio eletrolítico dos tecidos.

Já o mineral presente em menor quantidade foi o Cu (0,73 mg/100g), como observado por Benassi e Prudencio (2013).

Os resultados obtidos neste trabalho estão abaixo aos encontrados por Benassi e Prudencio (2013), em diferentes cultivares de soja, onde os valores estão compreendidos nas seguintes faixas: 1127,7-1624,4 mg K/100g, 1,4-1,7 mg Cu/100g, 3,2-4,9 mg Zn/100g, 197,2-241,3 mg Mg/100g, com exceção para o mineral K (1127,7-1624,4 mg/100g) para o EHS e para os minerais Mn (2,1-5,3 mg/100g) e Ca (146,9-316,7 mg/100g) que possuem valores próximos. Já Felberg et al. (2004) em EHS obtiveram valores de 2,07 mg Mn/100g, 834,76 mg K/100g, 144,29 mg Mg/100g e 132,94 mg Ca/100g.

De modo geral, os grãos de soja analisados neste trabalho apresentaram um conteúdo mineral acima dos valores encontrados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (UNICAMP, 2011) com 0,15 mg Mn/100g, 121,00 mg K/100g, 0,08 mg Cu/100g, 0,30 mg Zn/100g, 15,00 mg Mg/100g, 17,00 mg Ca/100g.

Tabela 3. Composição mineral dos grãos de soja e no extrato hidrossolúvel de soja.

Minerais (mg/100g)	Grãos de Soja	Extrato Hidrossolúvel de Soja
Mn	2,33 ($\pm 0,01$)	2,58 ($\pm 0,09$)
K	984,03 ($\pm 70,63$)	1376,46 ($\pm 131,83$)
Cu	0,73 ($\pm 0,01$)	1,10 ($\pm 0,01$)
Zn	2,20 ($\pm 0,11$)	2,64 ($\pm 0,54$)
Mg	131,46 ($\pm 8,33$)	191,29 ($\pm 3,16$)
Ca	182,39 ($\pm 5,75$)	147,13 ($\pm 4,75$)

Média (três repetições) \pm Desvio Padrão.

Fonte: autor.

O mineral cálcio é importante para a alimentação humana, pois traz benefícios a saúde, como prevenção da osteoporose, nos grãos de soja e no EHS analisados neste trabalho, ele encontra-se em grande quantidade (Tabela 3), por isso os derivados de soja podem ser consumidos para suprir este mineral.

De acordo com Felberg et al. (2004) o conteúdo de minerais da soja pode sofrer variações devido a múltiplos fatores, como influência físico-química do solo, aplicação de fertilizantes, condições ambientais, diferenças entre cultivares de soja e condições durante o processo de preparo dos grãos.

5.1.3. Teor de isoflavonas

Na Tabela 4 são apresentados os teores de isoflavonas nos grãos de soja e no EHS. Observa-se que nos grãos as maiores quantidades de isoflavonas nas formas de agliconas, malonil-glicosiladas e glicosiladas, e no EHS, nas formas de agliconas, glicosiladas e malonil-glicosiladas, respectivamente.

Tabela 4. Teor de isoflavonas nos grãos de soja e no extrato hidrossolúvel de soja.

Isoflavonas (mg/100g)	Grãos de soja	Extrato hidrossolúvel de soja
Glicosiladas	33,90 ($\pm 0,63$)	39,46 ($\pm 0,85$)
Malonil-glicosiladas	57,59 ($\pm 1,20$)	37,35 ($\pm 2,24$)
Agliconas	58,75 ($\pm 2,79$)	77,54 ($\pm 3,51$)
Isoflavonas Totais	150,24 ($\pm 6,61$)	154,36 ($\pm 6,61$)

Média (três repetições) \pm Desvio Padrão.

Fonte: autor.

Seibel et al. (2013), avaliando oito cultivares de soja, encontraram valores para isoflavonas glicosiladas de 27,90 mg/100g na cultivar BRS 257 e 47,50 mg/100g na cultivar BRS 216, para malonil-glicosiladas de 66,84 mg/100g na cultivar BRS 213 e 60,97 mg/100g na cultivar BRS 216 e para isoflavonas totais de 148,74 mg/100g na cultivar BRS 267.

Os resultados de isoflavonas obtidos neste trabalho, para os grãos, foram menores que os reportados por Gonçalves et al. (2014) para a cultivar BRS 284 e Ciabotti et al. (2006) para o grão de soja comum, com 72,51 mg/100g e 75,69 mg/100g para glicosiladas, 516,29 mg/100g e 83,94 mg/100g para malonil-glicosiladas e 591,70 mg/100g e 174,51 mg/100g para isoflavonas totais, com exceção do resultado de agliconas com 2,89 mg/100g e 1,22 mg/100g, respectivamente.

De acordo com Barbosa, Lajolo e Genovese (2006), no grão *in natura* predominam as formas malonil- β -glicosídeos, estas são instáveis e podem ser degradadas a agliconas pela ação da enzima β -glicosidase. Carrão-Panizzi, Simão e Kikuchi (2003) observaram que tratamentos hidrotérmicos dos grãos, com temperaturas e períodos de tempo adequados, podem proporcionar maior desenvolvimento de isoflavonas agliconas (compostos biodisponíveis responsáveis por efeitos benéficos à saúde humana), garantindo a obtenção de produtos à base de soja com maior teor desses compostos.

Esses resultados demonstram que, entre as diferentes cultivares de soja, podem ocorrer variações nos teores de isoflavonas. Este fato se deve aos níveis de acumulação de isoflavonas e a variabilidade genética nos grãos de soja, dependendo do clima, principalmente a temperatura, durante o desenvolvimento da semente (CARRÃO-PANIZZI; SIMÃO; KIKUCHI, 2003; CARRÃO-PANIZZI et al., 2009; BENASSI; PRUDENCIO, 2013).

Seibel et al. (2013) ao avaliarem o EHS em oito cultivares de soja encontraram valores de 30,90 mg/100g para isoflavonas glicosiladas na cultivar BRS 257 e 31,01 mg/100g na cultivar BRS 282, 34,00 mg/100g para malonil-glicosiladas na cultivar BRS 232 e 143,45 mg/100g para isoflavonas totais na cultivar BRS 232. Kao et al. (2004) obtiveram teores de 72,51 mg/100g de isoflavonas glicosiladas, 84,93 mg/100g de isoflavonas malonil-glicosiladas, 89,37 mg/100g de isoflavonas agliconas e 336,15 de isoflavonas totais para o EHS. Em comparação com os resultados apresentados neste trabalho para os grãos de soja (Tabela 4), menores teores das formas malonil-glicosiladas foram obtidos para o EHS em virtude do processo de aquecimento do mesmo, devido à clivagem dos grupos ésteres malonil para as formas daidzina e genistina por ações do calor durante o tratamento (CIABOTTI et al., 2006).

De acordo com Benassi e Prudencio (2013), diferentes cultivares, condições de plantio (ano, local e temperatura média) e de pós-colheita/armazenamento dos grãos (umidade, temperatura, tempo de armazenagem), podem influenciar o conteúdo de isoflavonas e sua forma química. A etapa de aquecimento da água para triturar os grãos de soja e elaborar o EHS não acarreta perdas, mas favorece a conversão das formas glicosídicas em agliconas (JACKSON et al., 2002; BENASSI; PRUDENCIO, 2013). Aumento dos níveis de isoflavonas agliconas também foram reportadas por Ciabotti et al. (2006) e Ferreira et al. (2011), devido ao aquecimento e processos de moagem, contribuindo, desta forma, para que ocorresse a clivagem das formas glicosiladas e malonil-glicosiladas em agliconas. Segundo Benassi e Prudencio (2013), o aumento nas agliconas é propiciado pelas condições de processamento, que favorecem a conversão de outras formas químicas das isoflavonas.

5.2.PRESENÇA/AUSÊNCIA DAS ISOENZIMAS LIPOXIGENASES NOS GRÃOS E NO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA

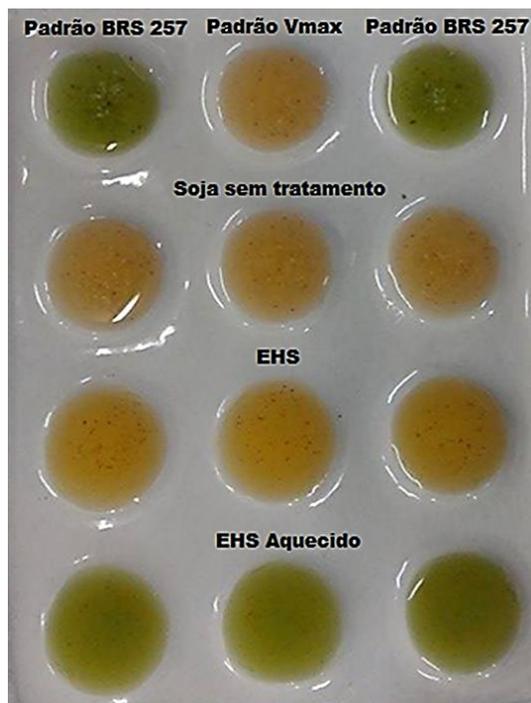
O processo de cozimento com posterior banho-maria por 10 min foi eficiente para inativar as lipoxigenases nos grãos de soja para obtenção do EHS (Figura 10). A primeira linha corresponde aos padrões, dispostos de maneira intercalada para melhor visualização da cor,

onde, o padrão BRS 257 corresponde a cultivar de soja que não apresenta as isoenzimas lipoxigenases (coloração verde) e o padrão Vmax corresponde a cultivar que apresenta as isoenzimas lipoxigenases (coloração amarela). A segunda linha corresponde os grãos de soja da cultivar convencional utilizados neste trabalho. A terceira linha corresponde ao EHS sem aquecimento. A quarta linha corresponde ao EHS aquecido, etapa anterior à adição dos coagulantes ao extrato para elaboração do tofu.

Observa-se que a segunda e terceira linha apresentam coloração amarela, o que significa que tanto os grãos de soja, quanto o EHS sem aquecimento apresentam as isoenzimas lipoxigenases. Já a quarta linha apresenta coloração verde para o EHS aquecido, isso significa que não há presença das isoenzimas lipoxigenases. Logo, o tofu também não irá apresentar as isoenzimas lipoxigenases.

O sabor característico denominado *beany flavor* originado da associação de compostos carbonílicos de cadeia longa com a fração proteica são catalisados pelas enzimas lipoxigenases, que correspondem a 1% do total de proteínas presentes nos grãos, melhorando a palatabilidade dos grãos de soja (RIGO et al., 2015; FELIX; CANNIATTI BRAZADA; MACHADO, 2011; MONTEIRO et al., 2004).

Figura 10. Teste colorimétrico para determinar a presença e ausência das isoenzimas lipoxigenases (LOX) nos grãos de soja, no extrato hidrossolúvel de soja sem aquecimento (EHS) e no extrato hidrossolúvel de soja aquecido (EHS aquecido).



Fonte: autor.

5.3.COAGULANTES VEGETAIS

5.3.1. Análise de pH e atividade de protease

Os valores de pH, conforme Tabela 5, se mostram diferentes para cada tipo de coagulante vegetal, sendo o coagulante de limão o mais ácido (2,5), seguido pelo coagulante de kiwi (3,4) e do coagulante de gengibre (6,6).

A atividade de protease (Tabela 5) também se mostrou diferente para os três coagulantes vegetais analisados. O coagulante de kiwi apresentou a maior atividade de protease (21,23 U/mL), seguido do coagulante de gengibre (4,14 U/mL) e do coagulante de limão (2,35 U/mL).

Grozdanovic, Burazer e Gavrovic-Jankulovic (2013), ao analisar extratos de kiwi em pH 5,0, obteve a atividade de protease de 0,46 mg/mL. Hashim et al. (2011b), observaram em seu trabalho a atividade proteolítica do coagulante de gengibre igual a 0,19 U/mg.

Tabela 5. Valores de pH e atividade de protease dos coagulantes vegetais de kiwi, gengibre e limão.

Coagulantes	pH	Atividade de protease (U/ml)
Kiwi	3,4 ($\pm 0,07$)	21,23 ($\pm 0,01$)
Gengibre	6,6 ($\pm 0,10$)	4,14 ($\pm 0,02$)
Limão	2,5 ($\pm 0,09$)	2,35 ($\pm 0,02$)

Média (três repetições) \pm Desvio Padrão.

Fonte: autor.

5.4.PROCESSAMENTO DO TOFU

5.4.1. Tofu I

O tofu I de kiwi, gengibre e limão (Figura 11) foi obtido da coagulação do EHS em temperatura ótima de coagulação de cada extrato vegetal, definida por Mazorra-Manzano et al. (2013) para o kiwi (40°C) e o gengibre (65°C) e por Adetunji et al. (2008) para o limão (80°C). Ao atingir a temperatura desejada, os coagulantes vegetais na concentração de 10% (Fasoyiro,

2014) com pH natural (kiwi ~ 4,0, gengibre ~ 6,0 e limão ~ 2,0) foram adicionados, juntamente com 600 μ L de CaCl_2 40%. A coagulação foi realizada por 40 min.

Observa-se (Figura 11) que o tofu I de kiwi e de gengibre apresentou aspecto e massa mais líquidos, diferindo do tofu I de limão, com aspecto mais granular e massa mais firme. Essa diferença visual entre os tofus pode ser justificada pela diferença dos pH e das temperaturas para coagulação do EHS, onde o melhor aspecto visual se deve ao menor pH (~ 2,0) e a maior temperatura (80°C) para coagulação (tofu I de limão).

Figura 11. Tofu I de kiwi, gengibre e limão, respectivamente, elaborados em condições de pH natural dos extratos vegetais (kiwi ~ 4,0, gengibre ~ 6,0 e limão ~ 2,0) e temperatura de coagulação de 40°C para kiwi, 65°C para gengibre e 80°C para limão, coagulados por 40 min.



Fonte: autor.

5.4.1.1. Análises físico-químicas tofu I

De acordo com os resultados apresentados das análises físico-químicas do tofu I (Tabela 6), para o conteúdo de cinzas é possível observar que houve diferença significativa ($p < 0,05$), entre o 1º e o 7º dia de armazenamento para o tofu I de kiwi, gengibre e limão. Estes resultados são semelhantes aos reportados por Kamizake, Silva e Prudencio (2016) que obtiveram valores de 0,74 g/100g e 0,84 g/100g para tofu (coagulado com $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) produzido com cultivar Coodetec 214 e BRS 267, respectivamente. Ciabotti et al. (2006) encontram valores de 0,76 g/100g para tofu produzido com soja comum coagulada com glucona- δ -lactona (GDL).

Li et al. (2015) encontram valores maiores (1,85 g/100g) do que o presente estudo, ao elaborar tofu com soja orgânica, coagulado com MgCl_2 . Assim como Benassi, Benassi e Prudencio (2011), que ao elaborarem tofu com diferentes cultivares de soja, coagulado com CaSO_4 , observaram valor de 6,02 g/100g. Com o decorrer do tempo de armazenamento, é

possível perceber que os valores de cinzas diminuem, este fato pode ser justificado pela liberação de soro durante o armazenamento, fazendo com que ocorra a migração de sais do tofu para o soro.

Os valores de acidez para o tofu de kiwi, gengibre e limão aumentaram com o tempo de armazenamento, mas não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre o 1º e o 7º dia de armazenamento. Resultados semelhantes aos mencionados neste trabalho foram obtidos 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), com valores variando de 0,16% a 0,42%. Segundo Fasoyiro (2014), os valores de acidez do tofu são dependentes do coagulante utilizado.

Tabela 6. Conteúdo de cinzas, acidez, pH e proteína bruta do tofu I de kiwi, gengibre e limão no 1º e no 7º dia de armazenamento.

Análise	Tofu I	Dias de armazenamento	
		1º	7º
Cinzas (g/100g)	Kiwi	0,66 ($\pm 0,09$) ^a	0,39 ($\pm 0,02$) ^b
	Gengibre	0,63 ($\pm 0,12$) ^a	0,36 ($\pm 0,03$) ^b
	Limão	0,94 ($\pm 0,26$) ^a	0,56 ($\pm 0,09$) ^b
Acidez (% ácido láctico)	Kiwi	0,17 ($\pm 0,03$) ^a	0,20 ($\pm 0,01$) ^a
	Gengibre	0,07 ($\pm 0,03$) ^a	0,11 ($\pm 0,01$) ^a
	Limão	0,10 ($\pm 0,05$) ^a	0,19 ($\pm 0,03$) ^a
pH	Kiwi	5,7 ($\pm 0,03$) ^a	5,7 ($\pm 0,03$) ^a
	Gengibre	6,5 ($\pm 0,01$) ^a	6,4 ($\pm 0,05$) ^a
	Limão	5,1 ($\pm 0,02$) ^a	5,0 ($\pm 0,06$) ^a
Proteína bruta (g/100g)	Kiwi	5,48 ($\pm 0,09$) ^a	5,55 ($\pm 0,07$) ^a
	Gengibre	4,72 ($\pm 0,10$) ^a	4,82 ($\pm 0,08$) ^a
	Limão	10,05 ($\pm 0,04$) ^a	10,00 ($\pm 0,05$) ^a

Média (três repetições) \pm Desvio Padrão seguidas de letras iguais minúsculas na linha (análises) para cada tempo de armazenamento de cada tofu indicam não haver diferença significativa a nível de 5% (teste de Tukey).

Fonte: autor.

Os valores de pH para o tofu de kiwi, gengibre e limão não diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre o 1º e o 7º dia de armazenamento. Valores próximos de pH foram encontrados

por Fasoyiro (2014) (5,3 a 6,2) para tofus produzidos com soja da variedade TGX-1448-IE, coagulados com diferentes concentrações do cálice de flores secas de Roselle.

A proteína bruta (Tabela 6) não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre o 1º e o 7º dia de armazenamento. O maior valor foi observado no tofu I de limão (10,05 g/100g), seguido pelo tofu I de kiwi (5,48 g/100g) e pelo tofu I de gengibre (4,72 g/100g). Estes resultados podem ser justificados de acordo com a metodologia de coagulação utilizada (pH 4,0 e 40°C para o kiwi e pH 6,0 e 65°C para o gengibre), onde os coagulantes de kiwi e de gengibre coagularam o EHS de forma mais lenta, fazendo com que ocorresse a formação de uma estrutura mais homogênea da coalhada e mais água fosse retida, aumentando o rendimento e modificando as propriedades físicas e o gel do tofu (Tabela 9) (PRABHAKARAN; PERERA; VALIYAVEETTIL, 2006; CIABOTTI et al., 2007; LI et al., 2015).

Kamizake, Silva e Prudencio (2016), encontraram valores semelhantes ao do tofu I de kiwi e gengibre para tofu produzido com soja da cultivar Coodetec 214 e BRS 267, coagulado com $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, com valores de 6,56 g/100g e 7,86 g/100g, respectivamente. Li et al. (2015), ao elaborar tofu com soja orgânica, coagulada com $MgCl_2$ (13,72 g/100g) e Ciabotti et al. (2006), no tofu elaborado com soja comum branqueada e coagulada com glucona- δ -lactona (GDL) (9,84 g/100g) observaram valores semelhantes ao obtido para o tofu I de limão. Valores superiores foram encontrados por Benassi, Benassi e Prudencio (2011), ao elaborar tofu com diferentes cultivares de soja, coagulada com $CaSO_4$ (52,75 g/100g).

5.4.2. Tofu II

Durante o processo para fabricação do tofu I, foi observado que o produto obtido com o coagulante de limão apresentava uma melhor formação de massa, sendo que este coagulante também apresenta o menor pH e a maior temperatura para coagulação. Com base nisso, foram realizados estudos, avaliando as condições de pH e temperatura de coagulação para os diferentes coagulantes.

Avaliação das condições de pH para coagulação do EHS

Observa-se na Tabela 7 os valores ajustados de pH dos coagulantes vegetais para ocorrência da coagulação do EHS.

Tabela 7. Valores ajustados de pH dos coagulantes vegetais de kiwi, gengibre e limão.

Coagulantes	pH ajustado		
	2,0	4,0	6,0
Kiwi	2,0 ($\pm 0,02$) ^a	4,0 ($\pm 0,02$) ^a	6,0 ($\pm 0,05$) ^a
Gengibre	2,0 ($\pm 0,03$) ^a	4,0 ($\pm 0,03$) ^a	6,0 ($\pm 0,03$) ^a
Limão	2,0 ($\pm 0,02$) ^a	4,0 ($\pm 0,04$) ^a	6,0 ($\pm 0,07$) ^a

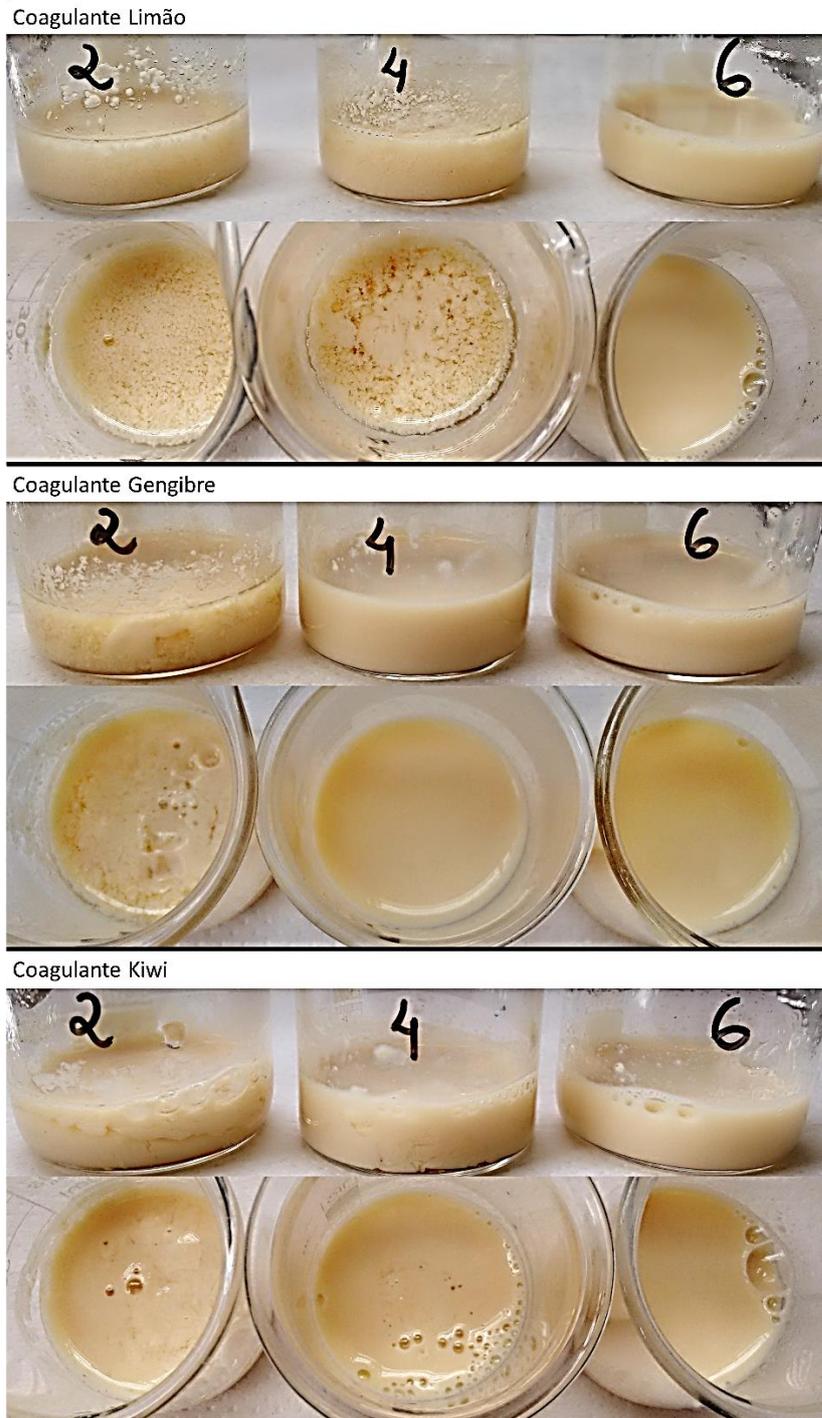
Média (três repetições) \pm Desvio Padrão seguidas de letras iguais minúsculas na coluna (análises) indicam não haver diferença significativa a nível de 5% (teste de Tukey).

Fonte: autor.

Na Figura 12 pode-se observar o comportamento dos coagulantes vegetais de kiwi, gengibre e limão na coagulação do EHS a 40°C para o kiwi, 65°C para o gengibre e 80°C para o limão, com os valores de pH ajustados para 2,0, 4,0 e 6,0, respectivamente. Observa-se que as características do coágulo formado são diferentes. No pH 2,0 obteve-se a melhor coagulação para os três coagulantes vegetais. No pH 4,0 obteve-se boa coagulação para os coagulantes de kiwi e de limão e fraca coagulação para o coagulante de gengibre. Já no pH 6,0 não ocorreu formação de massa firme para nenhum dos coagulantes vegetais.

Deste modo, percebe-se que quanto mais ácido estiver o coagulante vegetal, melhor será sua coagulação no EHS. Assim, o pH 2,0 foi o escolhido como o melhor pH para coagular o EHS para ambos os coagulantes vegetais utilizados neste trabalho.

Figura 12. Coagulação do extrato hidrossolúvel de soja com coagulante vegetal de limão, gengibre e kiwi, em pH 2,0, 4,0 e 6,0 e temperatura de 80°C, 65°C e 40°C, respectivamente.



Fonte: autor.

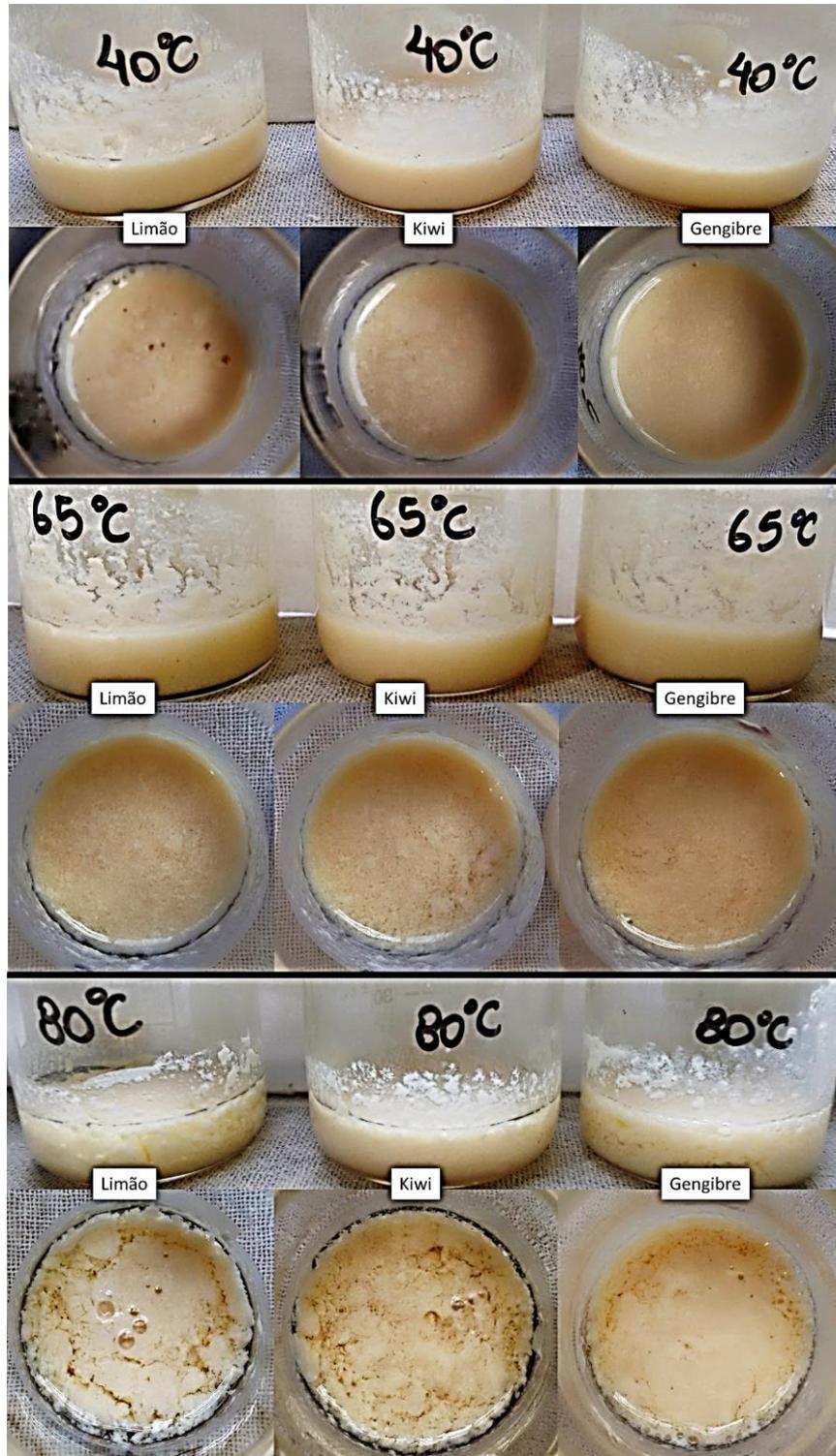
Avaliação das condições de temperatura para coagulação do EHS

De acordo com a Figura 13, podemos observar que com o pH fixado em 2,0, as temperaturas de 40°C, 65°C e 80°C agiram de maneiras diferentes para coagular o EHS. Observa-se que a menor temperatura (40°C) foi a que apresentou a menor coagulação do EHS, independente do coagulante vegetal utilizado.

Na temperatura de 65°C se observa que ocorreu a coagulação do EHS para os três coagulantes vegetais, após 40 min, porém, a melhor coagulação se mostra em temperatura de 80°C para os três coagulantes vegetais (limão, kiwi e gengibre) após 25 min.

Em termos de processamento, realizar a coagulação na temperatura de 80°C seria vantajoso, não necessitando reduzir a temperatura para coagular o EHS na saída do banho-maria (etapa de obtenção do EHS), além de diminuir o tempo de coagulação.

Figura 13. Coagulação do EHS com coagulante vegetal de limão, kiwi e gengibre em temperaturas de 40°C, 65°C e 80°C em pH 2,0, respectivamente.



Fonte: autor.

Elaboração do Tofu II

O tofu II foi elaborado a partir dos resultados obtidos na avaliação da influência do pH e temperatura dos coagulantes vegetais. A coagulação do EHS foi realizada a 80°C, com adição dos coagulantes (kiwi, gengibre e limão) em pH 2,0, e coagulação por 25 min.

A Figura 14 ilustra os tofus elaborados com kiwi, gengibre e limão coagulados com pH 2,0 e temperatura de 80°C, onde pode-se verificar que a massa formada apresenta o mesmo aspecto visual para todos os tofus.

Figura 14. Tofu II de kiwi, gengibre e limão, coagulados com pH 2,0 e temperatura de 80°C.



Fonte: autor.

5.4.2.1. Análises físico-químicas tofu II

De acordo com os resultados das análises de composição química (Tabela 8), pode-se observar que o conteúdo de cinzas não diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre o tofu II de kiwi, gengibre e limão, no 1º e o 7º dia de armazenamento. Kamizake, Silva e Prudencio (2016) encontraram valores próximos (0,74 g/100g e 0,84 g/100g) para tofu, coagulado com $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, produzido com cultivar Coodetec 214 e BRS 267, respectivamente. Ciabotti et al. (2006), para tofu produzido com soja comum, branqueada, coagulado com glucona- δ -lactona (GDL), encontrou valores de 0,76 g/100g. Fasoyiro (2014) encontrou valores (4,1 g/100g a 5,8 g/100g) maiores que o presente estudo, ao analisar tofus produzidos com soja da variedade TGX-1448-IE, coagulados com diferentes concentrações do cálice de flores secas de Roselle.

Tabela 8. Conteúdo de cinzas, acidez, pH e proteína bruta do 1º e do 7º dia de armazenamento das amostras de tofu II (kiwi, gengibre e limão).

Análise	Tofu II	Dias de armazenamento	
		1º	7º
Cinzas (g/100g)	Kiwi	0,53 ($\pm 0,04$) ^a	0,44 ($\pm 0,14$) ^a
	Gengibre	0,53 ($\pm 0,01$) ^a	0,51 ($\pm 0,02$) ^a
	Limão	0,53 ($\pm 0,01$) ^a	0,48 ($\pm 0,06$) ^a
Acidez (% ácido láctico)	Kiwi	0,06 ($\pm 0,02$) ^a	0,06 ($\pm 0,02$) ^a
	Gengibre	0,07 ($\pm 0,01$) ^a	0,03 ($\pm 0,04$) ^a
	Limão	0,09 ($\pm 0,02$) ^a	0,07 ($\pm 0,01$) ^a
pH	Kiwi	5,2 ($\pm 0,04$) ^a	5,1 ($\pm 0,02$) ^a
	Gengibre	5,2 ($\pm 0,34$) ^a	5,1 ($\pm 0,27$) ^a
	Limão	4,8 ($\pm 0,03$) ^a	4,7 ($\pm 0,03$) ^a
Proteína bruta (g/100g)	Kiwi	10,31 ($\pm 0,06$) ^a	10,28 ($\pm 0,03$) ^a
	Gengibre	10,27 ($\pm 0,05$) ^a	10,24 ($\pm 0,02$) ^a
	Limão	10,50 ($\pm 0,03$) ^a	10,47 ($\pm 0,01$) ^a

Média (três repetições) \pm Desvio Padrão seguidas de letras iguais minúsculas na linha (análises) para cada tempo de armazenamento de cada tofu indicam não haver diferença significativa a nível de 5% (teste de Tukey).

Fonte: autor.

Os valores de acidez do tofu II de kiwi, gengibre e limão não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre o 1º e o 7º dia de armazenamento (Tabela 8). Fasoyiro (2014), ao analisar tofu produzido com soja da variedade TGX-1448-IE (coagulado com *Calotropis procera*) obteve resultado semelhante (0,01%) ao do presente estudo. O mesmo autor, ao analisar tofus produzidos com soja da variedade TGX-1448-IE (coagulados com diferentes concentrações do cálice de flores secas de Roselle), obteve valores variando de 0,16% a 0,42%.

Os valores de pH (Tabela 8) não diferiram significativamente para o tofu II de kiwi, gengibre e limão, entre o 1º e o 7º dia de armazenamento. Fasoyiro (2014) encontrou valores próximos (5,3 a 6,2) aos deste trabalho para tofus produzidos com soja da variedade TGX-1448-IE, coagulados com diferentes concentrações do cálice de flores secas de Roselle.

O valor de proteína bruta do tofu II (Tabela 8) não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre o 1º e o 7º dia de armazenamento, sendo que os valores dos tofus II de kiwi, gengibre e limão foram próximos. Valores semelhantes ao deste trabalho foram obtidos por Li et al. (2015), ao elaborar tofu com soja orgânica (coagulado com $MgCl_2$) com 13,72 g/100g e

Ciabotti et al. (2006), no tofu elaborado com soja comum branqueada (coagulado com gluconato- δ -lactona (GDL)) com 9,84 g/100g. Kamizake, Silva e Prudencio (2016), encontraram valores menores aos deste trabalho, no tofu produzido com soja da cultivar Coodetec 214 e BRS 267, coagulado com $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, com valores de 6,56 g/100g e 7,86 g/100g, respectivamente.

5.4.3. Análise de rendimento e índice de sinérese

Na Tabela 9 são mostrados os resultados de rendimento e o índice de sinérese dos tofus I e II de kiwi, gengibre e limão. Ao observar os valores de rendimento para o tofu I, pode-se observar que o tofu com coagulante de kiwi e gengibre apresentou maior rendimento em relação ao com coagulante de limão, essa diferença pode ser justificada devido as diferenças nas condições de coagulação (80°C e pH 2,0 - limão; 65°C e pH 6,0 - gengibre; 40°C e pH 4,0 - kiwi) e por não ter ocorrido liberação do soro, onde os mesmos ficaram com aspecto aquoso, ou seja, não ocorreu completa dessoragem, o que fez com que o rendimento fosse maior. O tofu I de limão e os tofu II de kiwi, gengibre e limão ficaram com aspecto firme.

Tabela 9. Resultados de rendimento e índice de sinérese para o tofu I e o tofu II de kiwi, gengibre e limão.

Processo	Rendimento (g tofu/ 100g grão)	Índice de sinérese (%)		
		Dias de armazenamento		
		1º	7º	
Tofu I	Kiwi	23,82	44,33 ($\pm 0,16$) ^a	7,96 ($\pm 1,41$) ^b
	Gengibre	33,29	39,51 ($\pm 0,12$) ^a	4,68 ($\pm 1,19$) ^b
	Limão	11,82	10,99 ($\pm 0,08$) ^a	1,46 ($\pm 0,19$) ^b
Tofu II	Kiwi	10,94	9,70 ($\pm 1,74$) ^a	4,87 ($\pm 0,18$) ^b
	Gengibre	10,66	7,86 ($\pm 1,21$) ^a	2,47 ($\pm 1,39$) ^b
	Limão	10,65	8,21 ($\pm 1,43$) ^a	4,30 ($\pm 0,92$) ^b

Média (três repetições) \pm Desvio Padrão seguidas de letras iguais minúsculas na linha (análises) para cada tempo de armazenamento de cada tofu indicam não haver diferença significativa a nível de 5% (teste de Tukey).

Fonte: autor.

Fasoyiro (2014) encontrou valores superiores (87,3 g tofu/100g grão a 95,9 g tofu/100g grão) que o presente estudo, ao analisar tofus produzidos com soja da variedade TGX-1448-IE, coagulados com diferentes concentrações do cálice de flores secas de Roselle. Segundo Kong

et al. (2008), a etapa de coagulação e suas variantes tempo, velocidade de agitação, pH e concentração do coagulante também são fatores relevantes no rendimento do tofu.

Os valores de índice de sinérese (Tabela 9) demonstram que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o 1º e o 7º dia de armazenamento nos tofus I e II de kiwi, gengibre e limão. O tofu I de kiwi e gengibre apresentou maior liberação de soro do que o tofu I de limão e o tofu II de kiwi, gengibre e limão no 1º dia de armazenamento, isto se deve ao fato de que durante a dessora, o tofu de kiwi e gengibre, por apresentarem consistência aquosa, não liberaram totalmente o soro, fazendo com que no 1º dia de armazenamento, com maior precipitação das proteínas, ocorresse maior liberação de soro.

5.4.4. Avaliação instrumental de cor

Na Tabela 10, apresentam-se os valores médios das leituras da cor dos tofus I e II de kiwi, gengibre e limão, no 1º e no 7º dia de armazenamento. Verifica-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) no valor da luminosidade (L) para o tofu I e II entre o 1º e o 7º dia de armazenamento. Já para a intensidade de amarelo (b) para os tofus I e II de kiwi, gengibre e limão houve diferença significativa ($p < 0,05$) com o passar dos dias de armazenamento.

Tabela 10. Análise instrumental da cor do tofu I e do tofu II de kiwi, gengibre e limão, entre o 1º e o 7º dia de armazenamento.

Processo	Dias de armazenamento				
	1º		7º		
	L	b	L	b	
Tofu I	Kiwi	89,64 ($\pm 0,07$) ^a	13,65 ($\pm 0,04$) ^a	82,40 ($\pm 0,10$) ^a	12,46 ($\pm 0,15$) ^b
	Gengibre	86,67 ($\pm 0,18$) ^a	11,35 ($\pm 0,03$) ^a	84,03 ($\pm 1,00$) ^a	10,48 ($\pm 0,17$) ^b
	Limão	89,13 ($\pm 3,60$) ^a	12,79 ($\pm 0,26$) ^a	83,59 ($\pm 0,55$) ^a	11,30 ($\pm 0,32$) ^b
Tofu II	Kiwi	85,21 ($\pm 0,48$) ^a	15,62 ($\pm 0,49$) ^a	84,67 ($\pm 0,15$) ^a	14,84 ($\pm 0,22$) ^b
	Gengibre	85,58 ($\pm 0,66$) ^a	13,52 ($\pm 0,10$) ^a	84,92 ($\pm 0,02$) ^a	12,98 ($\pm 0,02$) ^b
	Limão	86,14 ($\pm 0,44$) ^a	13,84 ($\pm 0,52$) ^a	85,79 ($\pm 0,14$) ^a	12,29 ($\pm 0,05$) ^b

Média (três repetições) \pm Desvio Padrão seguidas de letras iguais minúsculas na linha (análises) para cada tempo de armazenamento indicam não haver diferença significativa a nível de 5% (teste de Tukey).

Onde: L = luminosidade ou brilho, varia do preto (0) ao branco (100); b = varia do azul (-60) ao amarelo (+60).

Fonte: autor.

Ciabotti et al. (2007) relataram que a cor característica do tofu comumente expressa a qualidade do produto, variando entre o branco e o amarelo-claro, de acordo com esta informação percebe-se que os tofus, elaborados neste trabalho, vão perdendo a intensidade amarelo (b), ou seja, perdendo qualidade com o maior tempo de armazenamento. Kamizake, Silva e Prudencio (2016), encontraram resultados semelhantes aos deste trabalho, em tofu produzido com soja da cultivar Coodetec 214 e BRS 267, coagulado com $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, com valores de luminosidade (L) de 86,20 e 84,82, respectivamente. Ciabotti et al. (2007), para tofu elaborado com soja comum (coagulado com glucona- δ -lactona (GDL)), encontram resultados de luminosidade (L) de 84,81 e valores de intensidade de amarelo (b) de 11,08. Li et al. (2015), ao elaborar tofu com soja orgânica, coagulado com $MgCl_2$, obteve luminosidade (L) de 78,62 e intensidade de amarelo (b) de 10,84.

5.5. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Os resultados das análises microbiológicas dos tofus I e II de kiwi, gengibre e limão no 1º e no 7º dia de armazenamento estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11. Análises microbiológicas de coliformes totais e termo tolerantes e de contagem total de bactérias psicrófilas no tofu I e no tofu II de kiwi, gengibre e limão, entre o 1º e o 7º dia de armazenamento.

Processo	Dias de armazenamento				
	1º		7º		
	Coliformes totais e termo tolerantes	Contagem total de bactérias psicrófilas	Coliformes totais e termo tolerantes	Contagem total de bactérias psicrófilas	
Tofu I	Kiwi	< 3 NMP/g	Ausente	1,5x10 ¹ NMP/g	Ausente
	Gengibre	< 3 NMP/g	Ausente	9 NMP/g	Ausente
	Limão	< 3 NMP/g	Ausente	< 3 NMP/g	Ausente
Tofu II	Kiwi	< 3 NMP/g	Ausente	< 3 NMP/g	Ausente
	Gengibre	< 3 NMP/g	Ausente	< 3 NMP/g	Ausente
	Limão	< 3 NMP/g	Ausente	< 3 NMP/g	Ausente

Fonte: autor.

De acordo com a resolução RDC n° 12, de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001), que fiscaliza e determina padrões microbiológicos e sanitários para o tofu, os valores para Coliformes a 45°C, devem apresentar valores menores que 10² NMP/g. A contagem total de bactérias psicrófilas não possui padrão de contagem para o tofu. Deste modo, os resultados microbiológicos (Tabela 11) para o tofu I e o tofu II de kiwi, gengibre e limão, entre o 1° e o 7° dia de armazenamento, para coliformes totais e termo tolerantes estão dentro dos padrões estabelecidos e para contagem total de bactérias psicrófilas estão ausentes.

6. CONCLUSÕES

No tofu I, o coagulante vegetal de limão apresentou a melhor formação de coalhada na temperatura de coagulação de 80°C e pH 2,0. No tofu II, após realização do teste de pH e de temperatura, utilizando os coagulantes vegetais com o mesmo valor de pH (2,0) e temperatura para coagulação (80°C), quimicamente e visualmente, os três coagulantes utilizados (kiwi, gengibre e limão) foram efetivos.

Durante o armazenamento de 7 dias dos tofus I e II não ocorreram mudanças de acidez, pH e proteína, sem alterações microbiológicas, indicando que até os 7 dias os tofus podem ser consumidos. Os rendimentos do tofu I de kiwi e gengibre, foi maior do que os rendimentos dos demais, apresentando também os maiores índices de sinérese.

Portanto, do ponto de vista tecnológico, pode-se concluir que utilizando os coagulantes de kiwi, gengibre e limão, com pH 2,0 e temperatura de coagulação de 80°C, obtêm-se a melhor formação da coalhada, ou seja, um tofu de massa firme. Assim, os tofus elaborados com coagulantes vegetais são uma alternativa de produto para os consumidores veganos.

6.1. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- ❖ Pesquisar alternativas para o uso do okara do EHS e do soro do tofu em alimentos;
- ❖ Realizar a caracterização dos extratos coagulantes vegetais;
- ❖ Fazer análise sensorial nos tofus;
- ❖ Estudar o aumento da porcentagem de adição de coagulante vegetal na elaboração dos tofus;
- ❖ Estudar a adição de proteína isolada de soja na elaboração dos tofus;
- ❖ Realizar a caracterização completa físico-química dos tofus;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABONIZIO, J. **Consumo alimentar e anticonsumismo: Veganos e freeganos.** Ciências Sociais Unisinos, v.42, n.2, p.191-196, 2013.
- ADETUNJI, V. O.; ALONGE, D. O.; SINGH, R. K.; CHEN, J. **Production of wara, a West African soft cheese using lemon juice as a coagulant.** Food Science and Technology, v.41, p.331-336, 2008.
- 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, n.18, p.3360-3362, 2008.
- ALBUQUERQUE, R. **Fruta com nome de passarinho.** Revista Natureza. São Paulo, n.201, p.70-74, 2004.
- ALEZANDRO, M. R.; ALMEIDA, S. A.; MAIA, P. P.; CARVALHO, H. A.; AZEVEDO, L.; VIEIRA, E. P. **Soja transgênica BRS 243 RR: Determinação de macronutrientes e das isoflavonas daidzeína e genisteína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.28, n.3, p.520-526, 2008.
- ALI, B. H.; BLUNDEN, G.; TANIRA, M. O.; NEMMAR, A. **Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research.** Food and Chemical Toxicology, v.46, n.2, p.409-420, 2008.
- AMARAL, A. **Alimentação Racional.** In : MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Eds.). A soja no Brasil. Campinas, SP. ITAL, p.832-839, 1981.
- AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. **Position of the american dietetic association and dietitians of Canada.** Canadian Journal of Dietetic Practice and Research, v.64, n.2, p.62-81, 2003.
- AMERICAM PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4 ed., Washington: APHA, 676 p., 2001.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Resolução n° 12, de 02 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União; Poder Executivo, 10 de janeiro de 2001.
- AOCS (American Oil Chemists' Society) (Champaign, Estados Unidos). **Official and tentative methods of the American Oil Chemists Society - método oficial Ba 11-65.** 3. ed. Champaign, 1969.
- AOCS (American Oil Chemists' Society) (Champaign, Estados Unidos). **Official and tentative methods of the American Oil Chemists Society - método oficial Ba 10-65.** 3. ed. Champaign, 1980.

- AXEROLD, B.; CHEESBROUGH, T. M.; LAASKO, S. **Lipoxygenases from soybeans**. *Methods Enzymol*, v.71, p.441-451, 1981.
- AZEVEDO, E. **Riscos e controvérsias na construção social do conceito de alimento saudável: o caso da soja**. *Revista Saúde Pública*, v.45, n.4, p.781-788, 2011.
- BALIGA, M. S.; HANIADKA, R.; PEREIRA, M. M.; D'SOUZA, J. J.; PALLATY, P. L.; BHAT, H. P.; POPURI, S. **Update on the chemopreventive effects of ginger and its phytochemicals**. *Critical Reviews In Food Science and Nutrition*, v.51, n.6, p.499-523, 2011.
- BARBOSA, A. C. L.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. **Influence of temperature, pH and ionic streng on the production of isoflavone-rich soy protein isolates**. *Food Chemistry*, v.98, n.4, p.757-766, 2006.
- BARBOSA, A. C. L. **Feijão com arroz e arroz com feijão: O Brasil no prato dos brasileiros**. *Horizontes Antropológicos*, Porto Alegre, ano 13, n.28, p.87-116, 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, n.1, p.1901-1914, 2011.
- BENASSI, V. T.; YAMASHITA, F.; PRUDENCIO, S. H. **A statistical approach to define some tofu processing conditions**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.31, n.4, 2011.
- 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*, Araraquara, v.23, n.4, p.555-565, 2012.
- 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, n.1, p.51-59, 2013.
- BERHOW, M. A. **Modern analytical techniques for flavonoid determination**. In: BUSLIG, B. S.; MANTHEY, J. A. (ed.). *Flavonoids in the living cell*. New York: Klusher Academic, p. 61 - 76, 2002.
- BOATTO, D. A.; MESOMO, M. C.; MADRONA, G. S.; BRANCO, I. G.; MATUMOTO-PINTRO, 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, n.3, p.766-770, 2010.
- BOLAND, M. J.; HARDMAN, M. J. **Kinect studies on the thiol protease from *Actinidia chinensis***. *FEBS Letters*, v.27, p.282-284, 1972.
- BOWLES, S.; DEMIATE, I. M. **Caracterização físico-química de *okara* e aplicações em pães do tipo francês**. *Ciência e Tecnologia de alimentos*, Campinas, v.6, n.3, p.652-659, 2006.

- BRANCO, I. G.; TEIXEIRA, A. M.; RIGO, M.; BASTOS, R. G. **Avaliação da aceitabilidade sensorial de uma bebida à base de extrato hidrossolúvel de soja, polpa de morango e sacarose.** Revista Ciências Exatas e Naturais, v.9, n.1, 2007.
- BRASILa. 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. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/14_78.htm>. Acesso em: 15 de março de 2014.
- BRASILb. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003.** Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Leite e Produtos Lácteos, 2003. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 15 de março de 2014.
- BRASILc. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 267, de 22 de setembro de 2005.** Regulamento técnico para produtos protéicos de origem vegetal, 2005. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3b43f08047457c0188d5dc3fbc4c6735/RDC_268_2005.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 15 de março de 2014.
- BRENNAN, C. S. **Dietary fiber, glycemic response, and diabetes.** Molecular Nutrition & Food Research, v.49, n.6, p.560-570, 2005.
- 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, n.3, p.657-663, 2010.
- BRUNELLI, L. T.; VENTURINI FILHO, W. G. **Caracterização química e sensorial de bebida mista de soja e uva.** Alimentação Nutrição, v.23, n.3, p.467-473, 2012.
- BUTT, M. S.; SULTAN, M. T. **Ginger and its health claims: Molecular aspects.** Critical Reviews In Food Science and Nutrition, v.51, n.5, p.383-393, 2011.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. **Soja: Potencial de uso na dieta brasileira.** In: Embrapa Soja. Documento 113. Londrina: Embrapa Soja, 1998.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; FAVONI, S. P. G.; KIKUCHI, A. **Extraction time for isoflavone determination.** Brazilian Archives of Biology and Technology, Curitiba, v. 45, n. 4, p. 515-518, 2002.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; SIMÃO, A. S.; KIKUCHI, A. **Efeitos de genótipos, ambientes e de tratamentos hidrotérmicos na concentração de isoflavonas agliconas em grãos de soja.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 38, n. 8, p. 897-902, 2003.

- 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, Brasília, v.44, n.11, p.1444-1451, 2009.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; SILVA, J. B. **Soja na alimentação humana: Qualidade na produção de grãos com valor agregado.** In: Congresso de la soja del Mercosur – MERCOSOJA, Rosário, Asociaciós de la Cadena de la Soja Argentina (ACSOJA), p.1-3, 2011.
- CARVALHO, W. T.; REIS, R. C.; VELASCO, P.; SOARES JÚNIOR, M. S.; BASSINELLO, P. Z.; CALIARI, M. **Características físico-químicas de extratos de arroz integral, quirera de arroz e soja.** Pesquisa Agropecuária Tropical, v.41, n.3, p.422-429, 2011.
- 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.
- CATALANI, A. L.; KANG, E. M. S.; DIAS, M. C. G.; MACULEVICIUS, J. **Fibras alimentares.** Revista Brasileira de Nutrição Clínica, v.18, p.178-182, 2003.
- CENTRO VEGETARIANO. **Tipos de vegetarianos.** Disponível em: <http://www.centrovegetariano.org/index.php?article_id=70>. Acesso em 15 de março de 2014, 2002.
- 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.
- CHOI, K. H.; LAURSEN, R. A. **Amino-acid sequence and glycan structures of cysteine proteases with proline specificity from ginger rhizome *Zingiber officinale*.** European Journal of Biochemistry, v.267, n.5, p.156-1526, 2000.
- 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, n.5, p.920-929, 2006.
- 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, Campinas, v.27, n.3, p.643-648, 2007.
- CIABOTTI, S.; BARCELOS, M. F. P.; CIRILLO, M. A.; PINHEIRO, A. C. M. **Propriedades tecnológicas e sensoriais de produto similar ao tofu obtido pela adição de soro de leite ao extrato de soja.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.29, n.2, p.346-353, 2009.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Produção de grãos deve chegar a 211 milhões de toneladas para safra 2015/16.** Disponível em:

- <<http://www.conab.gov.br/imprensa-noticia.php?id=39080>>. Acesso em 11 de dezembro de 2015.
- CUI, Z.; JAMES, A. T.; MIYAZAKI, S.; WILSON, R. F.; CARTER JR, T. E. **Breeding specialty soybeans for traditional and new soyfoods**. In: LIU, K. (Ed) Soybeans as functional foods and ingredients. Champaign: AOCS, p.290-295, 2004.
- DANIELS, J.; PEREIRA, D. G.; GROSSO, F. S.; MARTINS, T.; GONÇALVES, L. C.; SEIBEL, N. **Influência de diferentes variedades de soja e coagulantes na elaboração de tofu**. AMÉRICAS: International Conference on Soybean Utilization, 2013.
- DOMSALLA, A.; MELZIG, M. **Occurrence and properties of proteases in plant latices**. *Planta Medica*, v.74, n.7, p.699-711, 2008.
- EGITO, A. S.; LAGUNA, L. E. **Produtos regionais derivados de leite de cabras e perspectivas de mercado para o Brasil**. In: Reunião anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, João Pessoa, v.43, p.703-715, 2006.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Soja**. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?cod_pai=8&op_page=112>. Acesso em 15 de março de 2014a.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Soja: Histórico no Brasil**. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=113&cod_pai=35>. Acesso em 28 de maio de 2014b.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Soja em números (safra 2014/2015)**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em 17 de junho de 2015.
- 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.
- 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, n.2, p.97-102, 2014.
- FDA. Food and Drug Administration. **FDA final rule for food labeling: Health claims: Soy protein and coronary heart disease**. *Federal Register*, v.64, p.57700-57733, 1999.
- FELBERG, I.; DELIZA, R.; GONÇALVES, E. B.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. C.; CABRAL, L. C. **Bebida mista de extrato de soja integral e castanha-do-Brasil: Caracterização físico-química, nutricional e aceitabilidade do consumidor**. *Alimentos e Nutrição*, v.15, n.2, p.163-174, 2004.
- FELIX, M. A.; CANNIATTI BRAZACA, S. G.; MACHADO, F. M. V. F. **Análise sensorial dos grãos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tostados por diferentes tratamentos**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.31, n.1, p.56-64, 2011.

- FERGUSON, A. R.; BOLLARD, E. G. **Domestication of the kiwifruit**. In: WARRINGTON, I. F.; WESTON, G. C. *Kiwifruit: Science and management*. Auckland: Horticultural Science, p.165-256, 1990.
- 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, n.4, 464 p., 2002.
- FERREIRA, M. P.; OLIVEIRA, M. C. N.; MANDARINO, J. M. G.; SILVA, J. B.; IDA, E. I.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. **Changes in the isoflavone profile and in the chemical composition of tempeh during processing and refrigeration**. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v.46, n.11, p.1555-1561, nov. 2011.
- GAGAOUA, M.; HOGGAS, N.; HAFID, K. **Three phase partitioning of zingibain, a milk-clotting enzyme from *Zingiber officinale* Roscoe rhizomes**. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.73, p.245-252, 2015.
- GALÃO, O. F.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G.; LEITE, R. S.; CLAUS, T.; VISENTAINER, J. V. **Kunitz trypsin Inhibitor and phytic acid levels in conventional and genetically modified soybean seeds from Londrina and Ponta Grossa, South Brazil**. *Acta Scientiarum Technology*, v.36, n.4, p.727-731, 2014.
- GONÇALVES, L. C.; ANDRADE, A. P. C.; RIBEIRO, G. P.; SEIBEL, N. F. **Chemical composition and technological properties of two soybean cultivars**. *Biochemistry and Biotechnology Reports*, v.3, n.1, p.33-40, 2014.
- 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.
- GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G. **Rheological models of kiwifruit juice for processing applications**. *Journal of Food Processing and Technology*, v.2, 106 p., 2011.
- GUERREIRO, L. **Dossiê da soja: Produto da soja**. Rio de Janeiro, Redetec, 25 p., 2006.
- GUINEE, T. P.; FEENEY, E. P.; AUTY, M. A.; FOX, P. F. **Effect of pH and calcium concentration on some textural and functional properties of mozzarella cheese**. *Journal of Dairy Science*, v.85, p.1655-1669, 2002.
- GROZDANOVIC, M. M.; BURAZER, L.; GAVROVIC-JANKULOVIC, M. **Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) extract shows potential as a low-cost and efficient milk-clotting agent**. *International Dairy Journal*, v.32, p.46-52, 2013.
- HAN, J.; MORTON, J. D.; BEKHIT, A. E.; SEDCOLE, J. R. **Pre-rigor infusion with kiwifruit juice improves lamb tenderness**. *Meat Science*, v.82, p.324-330, 2009.

- HASHIM, M. M.a; MINGSHENG, D.; IQBAL, M. F.; LI, W.; XIAOHONG, C. **Ginger protease used as coagulant enhances the proteolysis and sensory quality of Peshawari cheese compared to calf rennet.** Dairy Science & Technology, v.91, n.4, p.431-440, 2011.
- HASHIM, M. M.b; MINGSHENG, D.; IQBAL, M. F.; XIAOHONG, C. **Ginger rhizome as a potencial source of milk coagulating cysteine protease.** Phytochemistry, v.72, p.458-464, 2011.
- HASHIMOTO, A.; TAKEUTI, Y.; KAWAHARA, Y.; YASUMOTO, K. **Proteinase and collagenase activities in ginger rhizome.** Journal of Japan Society of Nutrition and Food Science, v.44, p.127-132, 1991.
- 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.
- HEIFFIG, L. S.; AGUILA, J. S.; KLUGE, R. A. **Caracterização físico-química e sensorial de frutos de kiwi minimamente processado armazenados sob refrigeração.** Revista Iberoamericana de Tecnologia Postcosecha, v.8, n.1, p.26-32, 2006.
- HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. **Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro.** Londrina Embrapa Soja, 3 ed., 2011.
- HYMOWITZ, T.; COLLINS, F. I.; PANCZNER, J.; WALKER, W. M. **Relationship between the content of oil, protein, and sugar in soybean seed.** Agronomy Journal, Madison, v.64, n.5, p.613-616, 1972.
- IAL (Instituto Adolfo Lutz). **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, São Paulo: IMESP, 3 ed., v.1, 1985.
- ICHIKAWA, Y.; SASA, H.; MICHI, K. **Purification of ginger protease.** Journal of Japan Society of Nutrition and Food Science, v.26, p.377-383, 1973.
- 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, London, v.37, p.1117-1123, 2002.
- KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. E.; PUSKI, G. **Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure.** Cereal Chemistry, v. 51, p. 376-383, 1974.
- 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.

- 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, p.6211-6216, 2003.
- KAO, T. H.; LU, Y. F.; HSIEH, H. C.; CHEN, B. H. **Stability of isoflavone glucosides during processing of soymilk and tofu.** Food Research International, v.37, n.9, p.891-900, 2004.
- KATSAROS, G. I.; TAVANTZIS, G.; TAOUKIS, P. S. **Production of novel dairy products using actinidina and high pressure as enzyme activity regulator.** Food Science and Emerging Technologies, v.11, p.47-51, 2010.
- KE, Z. L.; PAN, Y.; XU, X. D.; NIE, C.; ZHOU, Z. Q. **Citrus flavonoids and human cancers.** Journal of Food and Nutrition Research, v.3, n.5, p.341-351, 2015.
- KIKUCHI, A. **Simple and rapid method for the detection of lipoxygenase isozymes in soybean seeds.** JIRCAS Anual Report 2001 n.8, p.47-48, 2001.
- 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.
- KOHYAMA, K.; SANO, Y.; DOI, E. **Rheological characteristics and gelation mechanism of tofu (soybean curd).** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.43, n.7, p.1808-1812, 1995.
- KONG, F.; CHANG, S. K.; LIU, Z.; WILSON, L. A. **Changes of soybean quality during storage as related to soymilk and tofu making.** Journal of Food Science, v.73, n.3, p.134-144, 2008.
- KWOK, K. C.; MACDOUGALL, D. B.; NIRANJAM, K. **Reaction kinetics of heat-induced colour changes in soymilk.** Journal of Food Engineering, v.40, n.1, p.15-20, 1999.
- KRUIF, C. G. **Skim milk acidification.** Journal of Colloid and Interface Science, v.185, p.19-25, 1997.
- LAROCCA, M.; ROSSANO, R.; RICCIO, P. **Analysis of green kiwi fruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) proteinases by two-dimensional zymography and direct identification of zymographic spots by mass spectrometry.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v.90, p.2411-2418, 2010.
- LI, J.; HSIEH, Y. P. **Traditional Chinese food technology and cuisine.** Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, v.13, n.2, p.147-155, 2004.
- LI, J.; QIAO, Z.; TATSUMI, E.; SAITO, M.; CHENG, Y.; YIN, L. **A novel approach to improving the quality of bittern-solidified tofu by w/o controlled-release coagulant. 2: Using the improved coagulant in tofu processing and product evaluation.** Food and Bioprocess Technology, v.6, n.7, p.1801-1808, 2013.

- 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.
- LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology and utilization.** New York, Chapman & Hall, 532 p., 1999.
- LIU, Z. S.; CHANG, S. K. C.; LI, L. T.; TATSUMI, E. **Effect of selective thermal denaturation of soybean proteins on soymilk viscosity and tofu's physical properties.** Food Research International, v.37, n.8, p.815-822, 2004.
- 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.
- LO PIERO, A. R.; PUGLISI, I.; PETRONE, G. V. **Characterization of the purified actinidina as a plant coagulant of bovine milk.** European Food Research and Technology, v.233, p.517-524, 2011.
- MACHADO, M. I.; LAMEIRO, M. G. F.; BORGES, S.; CORREA, A. P. A.; HELBIG, E.; ZAMBIAZI, R. **Poder antioxidante e vitamina C de polpas de kiwi nacional e chileno.** In: XIX Congresso de Iniciação Científica UFPEL. Pelotas. 2010.
- MÄKINEN, O. E.; WANHALINNA, V.; ZANNINI, E.; ARENDT, E.K. **Foods for special dietary needs: Non-dairy plant based milk substitutes and fermented dairy type products.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2015.
- 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. Viçosa, p.55-80, 2008.
- MANDARINO, J. M. G. **Compostos antinutricionais da soja: Caracterização e propriedades funcionais.** In: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos. Rio de Janeiro, Rubio, p.177-192, 2010.
- 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, n.1, p.93-102, 2013.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 3 ed, 386 p., 2007.

- MATHIAS, J.; SILVEIRA, S. V. **Kiwi**. Revista Globo Rural. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/Revista/Common/0,,EMI308159-18291,00-KIWI.html>>. Acesso em: 22 de abril de 2015.
- 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.
- McDOWALL, M. A. **Anionic proteinase from *Actinidia chinensis***. Preparation and properties of the crystalline enzyme. European Journal of Biochemistry, v.14, p.214-221, 1970.
- MEHL, F.; MARTI, G.; BOCCARD, J.; DEBRUS, B.; MERLE, P.; DELORT, E.; BAROUX, L.; RAYMO, V.; VELAZCO, M. I.; SOMMER, H.; WOLFENDER, J. L.; RUDAZ, S. **Differentiation of lemon essential oil based on volatile and non-volatile fractions with various analytical techniques: A metabolomic approach**. Food Chemistry, v.143, p.325-335, 2014.
- MELINA, V.; DAVIS, B.; HARRISON, V. **A dieta saudável dos vegetais: O guia completo para uma nova alimentação**. Rio de Janeiro, Editora Campus, 1998.
- MIN, S.; YU, Y.; ST. MARTIN, S. **Effect of soybean varieties and growing locations on the physical and chemical properties of soymilk and tofu**. Journal of Food Science, v.70, n.1, p.C8-C12, 2005.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Soja**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/cultura/soja>>. Acesso em 15 de março de 2014.
- MONTEIRO, M. R. P.; 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 tripsina kunitz e das isoenzimas lipoxigenases**. Revista de Nutrição, v.17, n.2, p.195-205, 2004.
- MORAIS, A. A. C.; SILVA, A. L. **Soja: Suas aplicações**. Rio de Janeiro, MEDSI, 259 p., 1996.
- MORETTI, R. H.; HINOJOSA, R. G. **Produção de “leite” de soja em escala semi-industrial**. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. A soja no Brasil. Campinas, ITAL, cap.15, item 2.3, p.979-986, 1981.
- NAKAJIMA, V. M.; OLIVEIRA, C. G.; COSTA, A. G. V.; PAIXÃO, M. P. C.; ARRUDA, A. C.; MINIM, V. P. R. **Hábitos e motivações para o consumo ou não consumo de extrato hidrossolúvel de soja**. Alimentos e Nutrição, v.21, n.4, p.633-642, 2010.
- NEGRELLE, R.; ELPO, E.; RUCKER, N. **Análise prospectiva do agronegócio gengibre no estado do Paraná**. Horticultura Brasileira, v.23, n.4, p.1022-1028, 2005.
- NIK, A. M.; ALEXANDER, M.; POYSA, V.; WOODROW, L.; CORREDIG, M. **Effect of soy protein subunit composition on the rheological properties of soymilk during acidification**. Food Biophysics, v.6, p.26-36, 2011.

- 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.
- OLIVEIRA, J. E. D. **Valor da soja como alimento.** In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Eds.). A soja no Brasil. Campinas, SP: ITAL, p.820-823, 1981.
- ORDÓÑES, J. Á.; RODRIGUEZ, M. I. C.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnología de Alimentos: alimentos de origem animal.** Porto Alegre: Artmed, v.2, 41 p., 2005.
- PAIVA, B. M.; ALVES, R. M.; HELENO, N. M. **Propriedades funcionais da soja.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.27, n.230, p.15-18, 2006.
- 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 Physiol Biochem, v.40, p.521-530, 2002.
- PAULETO, B. F.; FOGAÇA, A. O. **Avaliação da composição centesimal de tofu e okara.** Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v.13, n.1, p.85-95, 2012.
- PENALVO, J. L.; CASTILHO, M. C.; SILVEIRA, M. I. N.; MATALLANA, M. C.; TORIJA, M. E. **Fatty acid profile of traditional soymilk.** European Food Research Technoogy, v.219, n.3, p.251-253, 2004.
- PEREIRA, M. **Como ser vegano na terra do churrasco? O enquadramento da viabilidade de prognóstico do movimento pelos direitos animais em Porto Alegre.** In: MASSAÚ, Guilherme Camargo; RODRIGUES, Léo Peixoto; COELHO, Gabriel Bandeira. (Org.). Diversidade Sociológica – Facetas da pesquisa em sociologia. Porto Alegre: EDIPUCRS, p.131-154, 2014.
- 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.
- POYSA, V.; WOODROW, L. **Stability of soybean seed compositions and its effect on soymilk and tofu yield and quality.** Food Research International, v.35, p.337-345, 2002.
- POYSA, V.; WOODROW, L.; YU, K. **Effect of soy protein subunit composition on tofu quality.** Food Research International, Barking, v.39, n.3, p.309-317, 2006.
- 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, p.492-499, 2006.
- PRUDENCIO, E. S.; BENEDET, H. D. **Aproveitamento do soro de queijo na obtenção do extrato hidrossolúvel de soja.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.19, n.1, p.97-101, 1999.

- RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; RENGARAJAN, T.; PALANISWAMI, R.; GNANADHAS, E. N.; LAKSHMINARASAIHAH, U.; GOPAS, J.; NISHIGAKI, I. **Antioxidants and human diseases**. *Clinica Chimica Acta*, v.436, p. 332-347, 2014.
- 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, n.3, p.597-635, 1998.
- RAVINDRAN, P. N.; BABU, K. N. **Ginger: The genus zingiber**. *Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles*, CRC Press, v.41, 552 p., 2005.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. BATEMAN, A. **MEROPS: the peptidase database**. *Nucleic Acids Research*, v.38, p.227-233, 2010.
- RIGO, A. A.; DAHMER, A. M.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J. **Characterization of soybean cultivars genetically improved for human consumption**. *International Journal of Food Engineering*, v.1, n.1, 2015.
- RODRIGUES, R. S.; GOZZO, A. M.; MORETTI, R. H. **Comportamento reológico de extratos de grãos, farinha integral e isolado proteico de soja**. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Curitiba*, v.21, n.2, p.367-378, 2003.
- 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, n.2, p.76-85, 2003.
- RUSTOM, I. Y. S.; LÓPEZ-LEINA, M. M.; NAIR, B. M. **UHT sterilized peanut beverages: Kinetics of physicochemical changes during storage and shelf-life prediction modeling**. *Journal of Food Science, Sweden*, v.61, n.1, p.198-203, 1996.
- SABATÉ, J. **The contribution of vegetarian diet to health and disease: A paradigm shift?** *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.78 (3 suppl), n.50, p.2S-7S, 2003.
- SAHA, B. C.; HAYASHI, K. **Debittering of protein hydrolysates**. *Biotechnology Advances*, v.19, p.355-370, 2001.
- SALMON, C. N. A.; BAILEY-SHAW, Y. A.; HIBBERT, S.; GREEN, C.; SMITH, A. M.; WILLIAMS, L. A. D. **Characterisation of cultivars of Jamaican ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) by HPTLC and HPLC**. *Food Chemistry*, v.131, p.1517-1522, 2012.
- SAQUET, A. A.; BRACKMAN, A. A. **A cultura do kiwi**. *Ciência Rural*, v.25, n.1, p.177-182, 1995.
- SEIBEL, N. S.; ALVES, F. P.; OLIVEIRA, M. A.; LEITE, R. S. **Brazilian soybean varieties for human use**. *Soybean Bio-Active Compounds, InTech*, 546 p., 2013.
- SERRAZANETTI, D. I.; NDAGIJIMANA, M.; MISEROCCHI, C.; PERILLO, L.; GUERZONI, E. **Fermented tofu: Enhancement of keeping quality and sensorial properties**. *Food Control*, v.34, n.2, p.336-346, 2013.

- SILVA, F. C. **Análise química do tecido vegetal.** In: Manual de análises químicas de solo, plantas e fertilizantes. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2 ed., p.193-304, 2009.
- 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.
- SU, H. P.; HUANG, M. J.; WANG, H. T. **Characterization of ginger proteases and their potential as a rennin replacement.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v.89, n.7, p.1178-1185, 2009.
- SUDA, I.; HAJIKA, M.; NISHIBA, Y.; FURUTA, E.; IGITA, K. **Simple and rapid method for the selective detection of individual lipoxygenase isozymes in soybean seeds.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 43, p. 742-747, 1995.
- TEIXEIRA, R. C. A. A.; MOLINA, M. C. B.; FLOR, D. S.; ZANDONADE, E.; MILL, J. G. **Estado nutricional e estilo de vida em vegetarianos e onívoros – Grande Vitória – ES.** Revista Brasileira de Epidemiologia, v.9, n.1, p.131-143, 2006.
- 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 cardunculidus*.** Journal of Food Quality, v.30, p.91-103, 2007.
- THOMPSON, E. H.; WOLF, I. D.; ALLEN, C. E. **Ginger rhizome: A new source of proteolytic enzyme.** Journal of Food Science, v.38, n.4, p.652-655, 1973.
- TRIGUEIRO, A. **Consumo, ética e natureza: O veganismo e as interfaces de uma política de vida.** Revista Internacional Interdisciplinar INTERthesis, v.10, n.01, 237 p., 2013.
- TRUCOM, C. **O poder de cura do limão.** Alaúde, 2 ed., 208 p., 2004.
- 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.
- UNICAMP – Universidade de Campinas. NEPA. **Tabela brasileira de composição de alimentos – TACO.** Campinas, 4 ed. revisada e ampliada, 161 p., 2011.
- YANG, A.; JAMES, A. T. 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.
- 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, 2015.

- ZHANG, H.; XI, W.; YANG, Y.; ZHOU, X.; LIU, X.; YIN, S.; ZHANG, J.; ZHOU, Z. **Na on-line HPLC-FRSD system for rapid evaluation of the total antioxidante capacity of *Citrus* fruit.** Food Chemistry, v.172, p.622-629, 2015.
- ZOU, Z.; XI, W.; HU, Y.; NIE, C.; ZHOU, Z. **Antioxidant activity of *Citrus* fruits.** Food Chemistry, v.196, p.885-896, 2016.
- ZUCCHERELLI, G.; ZUCCHERELLI, G. **La actinida (kiwi).** Madrid: Mundi-Prensa, 228 p., 1987.
- WHITAKER, J. R. **The proteolytic enzymes.** Principles of Enzymology for the Food Sciences, 2 ed., v.61, n.19, p.469-498, 1994.
- WREGGE, M. S.; OLIVEIRA, R. P.; LIPP, J. P.; KOLLER, O. C.; STEINMETZ, S.; REISSER, C. J.; MATZENAUER, R. **Zoneamento agroclimático para produção de limas ácidas e de limões no Rio Grande do Sul.** Embrapa Clima Temperado, Pelotas, v.156, 36 p., 2006.