UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA EM BENTO GONÇALVES
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

NATÁLIA RAFAELA MENEGOTTO

DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTO VEGETAL TIPO QUEIJO PROBIÓTICO À BASE DE CASTANHA-DE-CAJU (*Anacardium occidentale L.*)

BENTO GONÇALVES

2022

NATÁLIA RAFAELA MENEGOTTO

DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTO VEGETAL TIPO QUEIJO PROBIÓTICO À BASE DE CASTANHA-DE-CAJU (*Anacardium occidentale L.*)

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como requisito parcial de obtenção do título de Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof.ª Dra. Francine Fioravanso Tramontina

Coorientadora: Prof.ª Ma. Marlene Guevara dos Santos

BENTO GONÇALVES

2022

Catalogação de publicação na fonte (CIP)

M541d Menegotto, Natália Rafaela

Desenvolvimento de alimento vegetal tipo queijo probiótico à base de Castanha-de-Caju (*Anacardium occidentale L.*) / Natália Rafaela Menegotto. – Bento Gonçalves: Uergs, 2022.

81 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Unidade em Bento Gonçalves, 2022.

Orientadora: Prof.ª Dra. Francine Fioravanso Tramontina

Corientadora: Prof.ª Me. Marlene Guevara dos Santos

1. Alimento à base de plantas. 2. *Bacillus clausii*. 3. Coagulação, Fermentação. 4. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). I. Tramontina, Francine Fioravanso. II. Santos, Marlene Guevara dos. III. Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Unidade em Bento Gonçalves, 2022. IV. Título.

Marcelo Bresolin CRB – 10/2136

NATÁLIA RAFAELA MENEGOTTO

DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTO VEGETAL TIPO QUEIJO PROBIÓTICO À BASE DE CASTANHA-DE-CAJU (*Anacardium occidentale L.*)

Monografia apresentada como requisito parcial de obtenção do título de Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.
Orientadora: Prof.ª Dra. Francine Fioravanso Tramontina
Coorientadora: Prof.ª Ma. Marlene Guevara dos Santos

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

_____
Orientadora: Prof.ª Dra. Francine Fioravanso Tramontina
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

_____
Prof.ª Dra. Ana Carolina Tramontina
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

_____
Prof.ª Dra. Christa Korzenowski
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

_____
Prof.º Dr. Fábio Luís Maciel
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

Dedico este trabalho, com muito amor, ao meu pai, minha mãe, irmã e vó Iva.

Dedico a todos os animais, que merecem todo respeito e amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Universo, a energia divina, pela vida e por conceder-me as oportunidades e caminhos para o crescimento.

Agradeço ao meu pai Rafael, minha mãe Janete e irmã Eduarda, ao privilégio de compartilhar essa existência com vocês, por todo amor e apoio, vocês me ensinam todos os dias sobre caráter, determinação, companheirismo e amor verdadeiro. Também, a Lisa, por me fazer companhia em todos os momentos. A toda minha família, em especial minha avó Iva, que mesmo não mais presente, sempre me cuidou e incentivou.

À minha colega e amiga Évelyn, por todo apoio, momentos compartilhados e por me ensinar sobre amizade. À Gabriela por todas as oportunidades de trabalharmos juntas. A todos os colegas de curso pelos auxílios e trocas de experiência.

Agradeço à minha orientadora e coorientadora por serem exemplos de mulheres e profissionais. À Professora Dra. Francine Fioravanso Tramontina, não tenho palavras para agradecer toda ajuda, dedicação, paciência e por abraçar meu trabalho. Agradeço por todos os ensinamentos, conselhos e a tudo que fez por mim. À Professora Ma. Marlene Guevara dos Santos por todos os ensinamentos e disponibilidade em ajudar.

A todos os professores que fizeram parte dessa minha caminhada, compartilhando seus conhecimentos. Também, à UERGS, pela oportunidade de estudo.

Meus sinceros agradecimentos a cada um de vocês!

RESUMO

O número de indivíduos com restrições ao consumo de leite e derivados cresce a cada ano, representando um público-alvo para a indústria alimentícia, sendo o queijo, o alimento declarado que mais sentem falta. Assim, constata-se a necessidade da área alimentícia em elaborar produtos que atendam ao seguimento. Diante disso e dos benefícios à saúde da castanha-de-caju e adição de microrganismos probióticos aos alimentos, o propósito deste trabalho é estudar diferentes tratamentos para a coagulação proteica do extrato vegetal de castanha-de-caju e o desenvolvimento de um alimento probiótico tipo queijo a partir do microrganismo *Bacillus clausii*. O extrato vegetal foi produzido através da maceração da castanha-de-caju com água mineral na proporção de 22,5 % (m/m) e filtração com tecido tipo *voil*. Para a avaliação da coagulação do extrato vegetal de castanha-de-caju, utilizou-se diferentes agentes coagulantes, como temperatura de 80 e 127 °C, ácido acético e cítrico para o ajuste do pH em 3, 4 e 5, e cloreto de sódio e sulfato de magnésio nas concentrações de 0,5, 1 e 2 % (m/v). Os agentes foram testados separadamente e de forma combinada. O tratamento que apresentou melhor aspecto visual, aparência do soro e porcentagem de coagulação proteica foi empregado na elaboração do queijo vegetal. O análogo de queijo probiótico à base de castanha-de-caju foi desenvolvido através da coagulação com ajuste de pH para 5 com ácido cítrico 1M e aquecimento em 127 °C à pressão de 1,5 kgf/cm^2, e fermentação da coalhada mediada por cultura de *Bacillus clausii* durante 72h. O produto obtido apresentou contagem de bactérias de 1,25 x 10^7 UFC/g após 72 horas de fermentação, teor de umidade 60 %, teor proteico de 10,55 % e rendimento em torno de 63 %.

Palavras-chave: Alimento à base de plantas. Coagulação. Fermentação. *Bacillus clausii*.

ABSTRACT

The number of individuals with restrictions on the consumption of milk and derivatives grows every year, representing a target audience for the food industry, with cheese being the declared food they miss the most. Thus, there is a need for the food sector to develop products that meet the needs of the segment. In view of this and the health benefits of cashew nuts and the addition of probiotic microorganisms to foods, the purpose of this work is to study different treatments for protein coagulation of cashew nut plant extract and the development of a probiotic food of the type cheese from the microorganism *Bacillus clausii*. The plant extract was produced by macerating cashew nuts with mineral water at a ratio of 22.5 % (m/m) and filtration with *voil* fabric. To evaluate the coagulation of the cashew nut plant extract, different coagulating agents were used, such as temperature of 80 and 127°C, acetic and citric acid to adjust the pH to 3, 4 and 5, and sodium chloride and magnesium sulfate at concentrations of 0.5, 1 and 2 % (w/v). The agents were tested separately and combined. The treatment that presented the best visual appearance, whey appearance and percentage of protein coagulation was used in the preparation of vegetable cheese. The probiotic cheese analogue based on cashew nuts was developed through coagulation with pH adjustment to 5 with 1M citric acid and temperature of 127 °C at a pressure of 1.5 kgf/cm^2, and fermentation of the curd mediated by *Bacillus clausii* culture for 72 h. The product obtained had a bacteria count of 1.25 x 10^7 CFU/g after 72 hours of fermentation, moisture content 60 %, 10.55 % protein content and yield around 63 %.

Key-words: Plant-based food. Coagulation. Fermentation. *Bacillus clausii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da micela de caseína 21
Figura 2 - Processo geral de fabricação do queijo 22
Figura 3 - Coagulação ácida e enzimática do leite 25
Figura 4 - Níveis de estrutura das proteínas 28
Figura 5 - Castanha-de-caju e pedúnculo 35
Figura 6 - Dispersão coloidal diluída com base vegetal 36
Figura 7 - Curva de crescimento microbiano 39
Figura 8 - Castanha-de-caju crua e hidratada 42
Figura 9 - Trituração da castanha-de-caju 43
Figura 10 - Filtragem e obtenção do extrato vegetal 43
Figura 11 - Coagulação do extrato vegetal 48
Figura 12 - Dessoragem do coágulo 49
Figura 13 - Moldagem e fermentação dos coágulos 50
Figura 14 - Queijos vegetais armazenados nos recipientes plásticos 51
Figura 15 - Análise sensorial 54
Figura 16 - Extrato vegetal de castanha-de-caju 55
Figura 17 - Tipos de coágulos obtidos com os tratamentos de coagulação 55
Figura 18 - Efeito de calor de 80º C e concentrações de sais e pH sobre a coagulação de proteínas do extrato vegetal de castanha-de-caju 56
Figura 19 - Efeito da combinação de calor a 80ºC e diferentes concentrações de sais sobre a coagulação de proteínas do extrato vegetal de castanha-de-caju 57
Figura 20 - Efeito da combinação do ajuste do pH e calor a 80°C e ajuste do pH para 3 e calor 127°C 57
Figura 21 - Efeito da combinação Ácido Acético e diferentes concentrações de NaCl e $MgSO_4$ sobre a coagulação de proteínas de extrato vegetal de castanha-de-caju 58
Figura 22 - Efeito da combinação Ácido Cítrico e diferentes concentrações de NaCl e $MgSO_4$ sobre a coagulação de proteínas de extrato vegetal de castanha-de-caju 59
Figura 23 - Tratamentos responsáveis pela formação do coágulo tipo 2 60
Figura 24 - Tratamentos responsáveis pela formação do coágulo tipo 3 62
Figura 25 - Placas de contagem das amostras em triplicata em 16h de fermentação 64
Figura 26 - Microrganismos viáveis nas amostras controle 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais constituintes do leite de vaca 20
Tabela 2 - Classificação mista dos queijos..... 27
Tabela 3 - Composição centesimal de extrato de castanha-de-caju..... 37
Tabela 4 - Porcentagem de proteína coagulada a partir dos métodos de coagulação 63
Tabela 5 - Resultado da contagem de microrganismos viáveis no extrato de castanha-de-caju e queijo vegetal em diferentes períodos de fermentação 64
Tabela 6 - Teor de umidade do análogo de queijo controle e probiótico..... 67
Tabela 7 - Resultado das análises de dosagem de proteínas do extrato e queijo vegetal..... 68
Tabela 8 - Valores médios e desvio padrão dos atributos e intenção de compra avaliados na análise sensorial do análogo de queijo controle e probiótico 69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Métodos de desnaturação de proteínas 29
Quadro 2 - Números dos tubos e métodos de coagulação testados 45
Quadro 3 - Combinação de calor e sais para a coagulação 45
Quadro 4 - Combinação de calor e acidificação por Ácido Acético e Ácido Cítrico para a coagulação 46
Quadro 5 - Combinação de diferentes concentrações de sais e ajustes de pH com Ácido Acético ou Ácido Cítrico 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

IBOPE – Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística

HTST – High Temperature Short Time

LTLT – Low Temperature Large Time

FIESP – Federação das Indústrias do Estado de São Paulo

NaCl – Cloreto de Sódio

$MgSO^4$ – Sulfato de Magnésio

PCA – Meio ágar padrão para a contagem

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

2 OBJETIVOS 18

2.1 OBJETIVO GERAL 18

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 18

3 REFERENCIAL TEÓRICO 19

3.1 VEGETARIANISMO E VEGANISMO 19

3.2 LEITE DE VACA 20

3.3 QUEIJO 22

3.4 COAGULAÇÃO DE PROTEÍNAS NA PRODUÇÃO DO QUEIJO 27

3.4.1 Conceito geral e estrutura de proteínas 27

3.4.2 Desnaturação de proteínas 29

3.4.3 Precipitação de proteínas 30

3.4.4 Coagulação de proteínas 30

3.5 QUEIJO VEGANO 31

3.6 PRODUÇÃO DO QUEIJO VEGETAL DE CASTANHA-DE-CAJU 34

3.6.1 Castanha-de-Caju 34

3.6.1.1 Extrato de Castanha-de-Caju 36

3.6.2 Coagulação do extrato vegetal 37

3.6.3 Microbiota dos queijos 38

3.7 ALIMENTOS PROBIÓTICOS 40

3.7.1 *Bacillus clausii* 40

4 MATERIAIS E MÉTODOS 42

4.1 INÓCULO 42

4.2 ELABORAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL DE CASTANHA-DE-CAJU 42

4.3 AVALIAÇÃO DA COAGULAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL 44

4.3.1 Tratamentos individuais para coagulação do extrato proteico 44

4.3.2 Combinação de diferentes tratamentos para coagulação do extrato proteico ... 45

4.4 ANÁLISE DA QUALIDADE DOS COÁGULOS 48

4.5 ELABORAÇÃO DO QUEIJO VEGETAL 48

4.5.1 Coagulação do extrato vegetal 48

4.5.2 Dessora do coágulo 49

4.5.3 Inoculação e moldagem do coágulo 49

4.5.4 Fermentação 50

4.5.5 Prensagem..... 50

4.5.6 Salga..... 50

4.6 ANÁLISE DO QUEIJO VEGETAL..... 51

4.6.1 Análise microbiológica 51

4.6.1.1 Análise microbiológica do extrato vegetal..... 52

4.6.1.2 Análise microbiológica dos queijos vegetais..... 52

4.6.2 Rendimento..... 52

4.6.3 Teor de umidade..... 52

4.6.4 Dosagem de proteínas 53

4.6.5 Análise sensorial 53

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 55

5.1 CARACTERÍSTICAS DO EXTRATO VEGETAL 55

5.2 AVALIAÇÃO DA COAGULAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL 55

5.2.1 Tratamentos que formaram o coágulo tipo 1 56

5.2.2 Tratamentos que resultaram na formação do coágulo tipo 2 60

5.2.3 Tratamentos que resultaram na formação do coágulo tipo 3 61

5.2.4 Considerações a respeito da escolha do método de coagulação 63

5.3 AVALIAÇÃO DO QUEIJO VEGETAL 64

5.3.1 Análise microbiológica 64

5.3.2 Rendimento e avaliação de custo 65

5.3.3 Teor de umidade 66

5.3.4 Dosagem de proteínas 67

5.3.5 Análise sensorial 68

6 CONCLUSÃO 71

6.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 71

REFERÊNCIAS 73

APÊNDICE A - FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL 80

1 INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados são alimentos muito consumidos. Entre eles, o queijo é um dos produtos que apresenta maior demanda por estar muito presente na dieta da população. Observa-se que 30 % da produção mundial de leite é destinada à fabricação de queijos (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009).

Ao mesmo tempo, a constatação do crescimento no número de indivíduos que apresentam limitações ao consumo de derivados de leite, tanto por questões de saúde, devido às reações adversas ao leite, quanto filosóficas, como veganismo e vegetarianismo, demonstra a necessidade da elaboração de produtos que atendam a esses grupos, e que apresentem propriedades sensoriais semelhantes aos alimentos disponíveis no mercado (SOCIEDADE VEGETARIANA BRASILEIRA, 2021).

Diante disso, o fornecimento de novos produtos sem ingredientes de origem animal é uma grande oportunidade para a indústria de alimentos atingir esse novo mercado potencial. Apesar do crescimento dessa nova categoria de consumidores, a área alimentícia não está devidamente preparada para atender esse mercado, sendo necessário o desenvolvimento de novos alimentos veganos e vegetarianos.

O queijo vegetal, é uma categoria de análogo de queijo não lácteo à base de plantas, que busca ter propriedades como, sabor, textura, cor e forma, semelhantes à do queijo de origem animal. A fabricação desse alimento à base de plantas pode ser realizada a partir de diferentes fontes vegetais, como soja, coco, amendoim, aveia, arroz e castanhas, e através de uma metodologia semelhante à da produção de queijos de origem animal, apresentando as seguintes etapas básicas: produção do extrato hidrossolúvel vegetal, coagulação, corte da coalhada, dessoragem, prensagem, moldagem, salga e maturação.

A castanha-de-caju (*Anacardium occidentale*) é um alimento de alto valor nutricional e rica em minerais, composta de 20 a 24 % de proteínas, 23 a 25 % de carboidratos e 40 a 57 % de lipídios (OLAYINKA *et al*. 2018). Essa oleaginosa apresenta grande potencial para a produção de laticínios veganos, pois além da sua importância nutricional e econômica para o país, possui proteínas com propriedades funcionais de alto potencial para serem utilizadas na indústria de alimentos (LIU *et al*., 2018).

A busca por um estilo de vida mais saudável aumentou o consumo de alimentos probióticos. Tendo em vista os benefícios dessa categoria de alimentos, a indústria de laticínios tem acrescentado em seus produtos culturas probióticas, definidas como microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando consumidos em doses adequadas. Dentre os microrganismos probióticos, o *Bacillus clausii*, bactéria Gram-positiva e formadora de esporos, é uma espécie capaz de estabelecer relações simbióticas com o organismo hospedeiro e proporcionar benefícios à saúde.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar diferentes tratamentos para a coagulação proteica do extrato vegetal de castanha-de-caju e a produção de um alimento probiótico tipo queijo, indicado aos indivíduos que não consomem alimentos de origem animal, por meio da fermentação mediada por cultura de *Bacillus clausii*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Elaborar um alimento tipo queijo à base de castanha-de-caju com características probióticas a partir da fermentação mediada por *Bacillus clausii*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com o intuito de atingir o objetivo geral apresentado, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

a) Avaliar o efeito do calor, pH e concentração salina sobre a coagulação proteica de extrato vegetal de castanha-de-caju quanto ao aspecto visual, aparência do soro e porcentagem de proteínas coaguladas;

b) Utilizar a melhor combinação de fatores coagulantes para produzir um alimento tipo queijo com metodologia semelhante à empregada na produção de queijos de origem animal;

c) Caracterizar o produto obtido através da umidade, rendimento, quantificação de proteínas e contagem de microrganismos;

d) Avaliar a aceitação e intenção de compra do produto desenvolvido por meio de análise sensorial.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 VEGETARIANISMO E VEGANISMO

As sociedades humanas, no decorrer da história, têm originado diversos modelos alimentares. Devido à inconsistência de informações, não se sabe ao certo quando a dieta vegetariana começou a ser empregada pelos humanos (DONEDA, 2021). Contudo, existem indícios científicos de que o vegetarianismo tenha surgido na pré-história com os primeiros hominídeos (CAVALHEIRO *et al*., 2018).

O vegetarianismo é uma dieta alimentar em que os indivíduos não consomem nenhum produto de origem animal. O termo vegetariano compreende uma vasta variedade de dietas, podendo ser classificado em: ovolactovegetarianismo (consomem ovos, leite e laticínios), lactovegetarianismo (incluem leite e laticínios na alimentação), ovovegetarianismo (utiliza ovos na dieta) e vegetarianismo estrito (restrição alimentar de todos os produtos de origem animal) (SOCIEDADE VEGETARIANA BRASILEIRA, 2022).

O veganismo, por sua vez, é um estilo de vida que, dentro do possível, discorda de qualquer modo de exploração animal. Com o objetivo de criar uma proposta dentro do vegetarianismo, o movimento surgiu em meados da década de 40 (FERRIGNO, 2012). Assim, os indivíduos veganos são contrários ao consumo de produtos de origem animal, a exploração para a realização de trabalho forçado, como componentes em produtos ou processos manufaturados (roupas, cosméticos, produtos de limpeza etc.), utilização de animais em pesquisas e para qualquer forma de entretenimento (circos, rodeios, zoológicos etc.) (TRIGUEIRO, 2013).

Diversos motivos fazem com que aumente a adesão de indivíduos a esse estilo de vida vegetariano e vegano. As principais razões estão associadas à ética e direito dos animais, saúde, meio ambiente e religião (COUCEIRO *et al*., 2008).

O movimento vegetariano e vegano vem crescendo a cada ano e tomando maiores dimensões no mercado mundial. Segundo pesquisa do IBOPE de abril de 2018, 14 % da população brasileira declarava-se vegetariana. Essa porcentagem representa 30 milhões de indivíduos, o que corresponde a um número de pessoas maior que a população total de alguns países como Austrália e Nova Zelândia. Além disso, a pesquisa revela que dentre as 2.002

pessoas entrevistadas, 60 % declararam que consumiriam esses alimentos se estivessem com o mesmo preço que os produtos que já estão acostumados a consumir.

Indivíduos que seguem esse estilo de vida representam um público-alvo novo para grandes instituições, que buscam proporcionar-lhes produtos alimentícios específicos. Contudo o mercado de alimentos veganos e vegetarianos não alcança somente os indivíduos pertencentes a esses grupos, mas também uma parte da população que procura reduzir o consumo de produtos de origem animal, como os indivíduos intolerantes à lactose. Tornando-se necessário desenvolver produtos nutritivos específicos para esses grupos e que apresentem características sensoriais semelhantes aos alimentos encontrados no mercado.

3.2 LEITE DE VACA

O leite de vaca, segundo a Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2009, é um produto proveniente da ordenha completa e ininterrupta, em circunstâncias higiênicas, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002). O leite é um produto muito consumido na alimentação humana e dispõe de um elevado grau de complexidade. Formado por mais de 20 componentes, sendo os principais apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais constituintes do leite de vaca

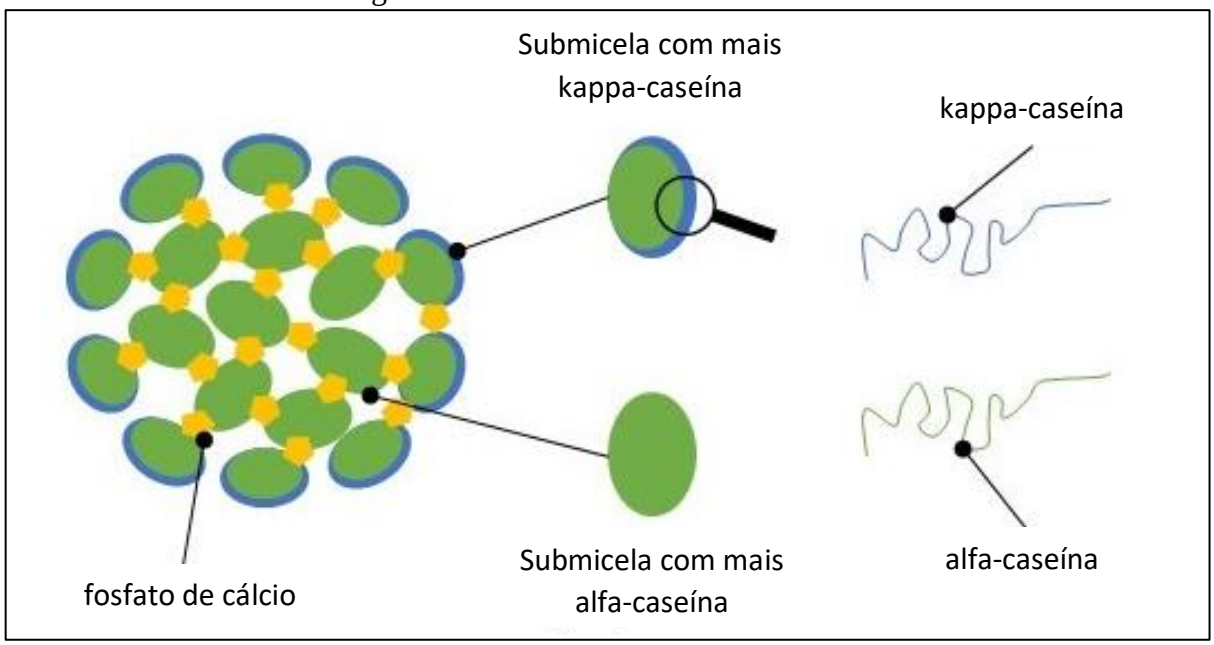
Constituinte	**Percentual**
Água	86,0 a 88,0
Sólidos Totais	12,0 a 14,0
Gordura	3,5 a 4,5
Proteína	3,2 a 3,5
Lactose	4,6 a 5,2
Mineiras	0,7 a 0,8

Fonte: Noro (2001)

Dentre a composição proteica do leite, que engloba diversas proteínas, 85 % são representadas por caseína, da qual existem vários tipos identificados (alfa, beta, gama e kappa-caseína). Enquanto a composição lipídica, é constituída em 98 % de triglicerídeos, e a lactose sendo o principal carboidrato presente no leite (NORO, 2001).

A caseína, principal proteína do leite, apresenta uma conformação molecular que expõe suas regiões hidrofóbicas e hidrofílicas. Devido a essa característica anfipática, as caseínas organizam-se em submicelas que interagem, principalmente por meio de fosfato de cálcio, formando as micelas, Figura 1. As proteínas alfa e beta-caseína, por serem moléculas hidrofóbicas, encontram-se dispostas no interior da micela, enquanto a superfície da estrutura é composta por kappa-caseína (DALGLEISH, 2011; SILVA *et al*., 2019).

Figura 1 - Estrutura da micela de caseína



Fonte: Cheese in the City (2019)

Apresentando uma utilização muito abrangente, o leite é um dos produtos mais versáteis da agroindústria. Além de ser uma bebida pronta para consumo, é utilizado como matéria-prima na fabricação de diferentes produtos na indústria alimentícia, como iogurte, sorvete, manteiga, doce de leite, queijo e outros (BAYER, 2019).

Entre os derivados do leite, o queijo é um dos produtos mais difundidos e, com isso, existe uma elevada demanda por esse alimento (CRUZ; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2020). Estima-se que 30 % da produção mundial de leite é destinada à fabricação de queijos (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009).

3.3 QUEIJO

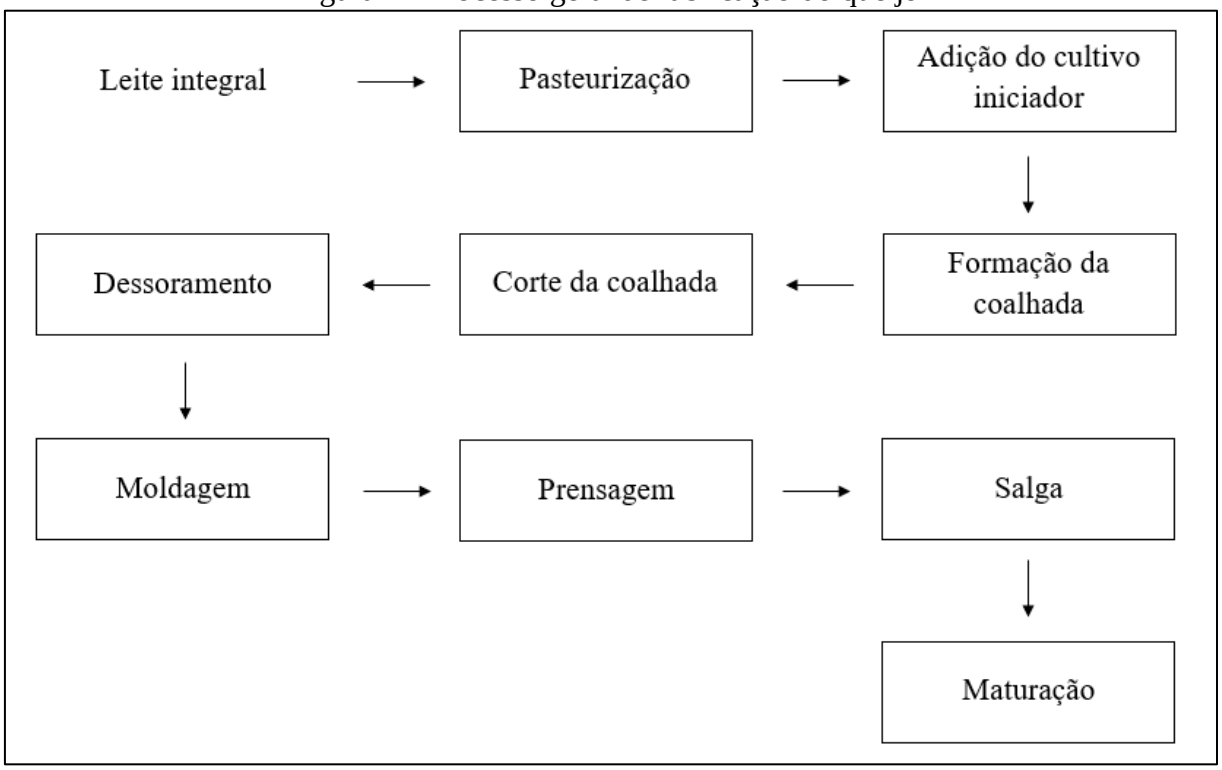
Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 1996), entende-se por queijo:

> O produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.

O queijo é basicamente um produto obtido a partir de um processo de coagulação do leite. Em que parte dos componentes sólidos, especialmente proteína e gordura, são concentrados na coalhada. Enquanto os sólidos solúveis, lactose e restante das proteínas permanecem presentes no soro do leite, parte aquosa removida durante a fabricação (FOX, 2000 citado por PAULA; CARVALHO; FURTADO 2009).

O processo para a elaboração do queijo compreende algumas etapas básicas apresentadas na Figura 2.

Figura 2 - Processo geral de fabricação do queijo



Fonte: adaptado de Ordóñez (2005)

A produção do queijo inicia com a seleção do leite, que normalmente é o de vaca, mas pode ser obtido a partir de diferentes mamíferos, como ovelha, cabra e búfala. A maior diversidade dos queijos é obtida através do leite integral. No entanto, dependendo do tipo de produto é preciso normatizar a quantidade de gordura. Em todo caso, o leite necessita ser livre de antibióticos e conter uma boa qualidade microbiológica, a fim de evitar qualquer reação indesejável. O queijo obtido através do leite cru só é permitido quando o produto é maturado por 60 dias a temperatura maior que 5 °C. Para os outros casos, realiza-se a pasteurização do leite cru, etapa responsável por destruir os microrganismos patogênicos e, assim, assegurar a saúde do consumidor (ORÓÑEZ, 2005).

A *pasteurização* é um tratamento térmico que pode ser realizada através de duas condições: o procedimento HTST, processo rápido que acontece em trocadores de calor a placas, em que o leite é aquecido a 72°C durante 15 minutos, ou por LTLT, processo de aquecimento lento, onde o leite permanece 30 minutos na temperatura de 65 °C. O leite pasteurizado apresenta redução do cálcio solúvel, o que resulta na perda de sua disposição para a coagulação. Assim, adiciona-se cloreto de cálcio, na proporção de 1,2 g/L, a fim de evitar atrasos na etapa de coagulação e para a obtenção de uma coalhada mais firme. Além disso, o tratamento térmico destrói a microbiota natural do leite, sendo necessário a adição de um cultivo iniciador constituído de bactérias lácticas (ORÓÑEZ, 2005).

A *adição do cultivo* iniciador é uma das operações chave na fabricação dos queijos, com a finalidade de produzir ácido lático através das bactérias lácticas e contribuir para a criação das propriedades sensoriais do alimento. Nessa fase estabelecem-se as circunstâncias para a produção de queijos moles ou duros e, entre esses dois extremos, existe a possibilidade de produzir todas as variedades de queijo. Na elaboração dos queijos moles, é necessário acumular ácido lático antes da formação da coalhada, mantendo-se o leite inoculado por determinado tempo e temperatura, possibilitando o crescimento do cultivo iniciador antes da incorporação do coalho. Enquanto nos queijos duros, adiciona-se o coalho em seguida do cultivo iniciador, praticamente não havendo a produção de ácido lático. Os gêneros de bactérias ácido láticas mais encontradas nos queijos são os *Lactococcus, Lactobacillus, Streptococcus, Leuconostoc* e *Enterococcus* (ORÓÑEZ, 2005; FOX, *et al*. 2000 citado por BRUNO; CARVALHO, 2009).

A *formação da coalhada* é a fase em que ocorre a obtenção da massa do queijo. Nessa operação adiciona-se o agente coagulante que através de modificações físico-químicas das micelas de caseína, ocasiona a coagulação do leite e formação de um coágulo firme, chamado

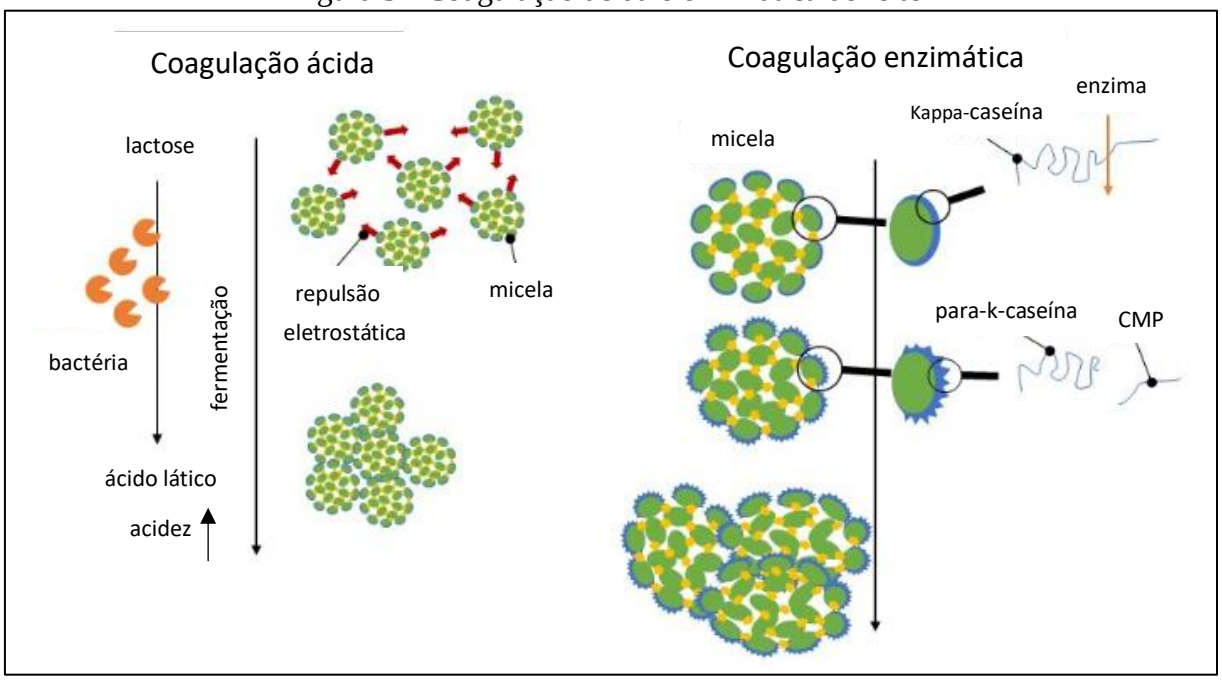
coalhada (LAMPERT; AGNOL, 2019). A coalhada pode ser obtida por meio de duas vias: láctica ou enzimática, representado na Figura 3.

A coalhada láctica é alcançada através de acidificação. A coagulação ácida consiste na diminuição do pH devido ao ácido lático produzido pelas bactérias láticas, através da fermentação da lactose. À medida que o pH do leite diminui, em direção ao ponto isoelétrico da caseína (pH de 4,6), às micelas sofrem alterações em suas cargas superficiais e se agregam formando uma rede proteica insolúvel que engloba a gordura, lactose e sais minerais. A temperatura influencia diretamente na precipitação das caseínas, visto que, em 20 °C obtém-se a precipitação em pH 4,6, enquanto a 40 °C ocorre próximo a 5,2 (ORÓÑEZ, 2005).

Enquanto a coalhada enzimática é obtida por intermédio da atividade do coalho ou de qualquer outra enzima coagulante. Tradicionalmente o coalho utilizado é a renina, enzima de origem animal extraída a partir do quarto estômago de bezerros lactantes, cujo princípio ativo é a quimosina e que apresenta baixas quantidades de pepsina. Contudo, em razão do aumento da produção mundial de queijo, estudos estão sendo realizados para desenvolver um substituto. Como é o caso do coalho microbiano produzido a partir de fungos ou leveduras específicas. A coagulação enzimática envolve a alteração das micelas do leite através da ação proteolítica do coalho sobre a caseína, proteína presente na camada superficial dessas partículas. Com a hidrólise da caseína, as micelas perdem sua estabilidade eletrostática e formam uma rede tridimensional, através de sua agregação, induzida pelo cálcio (PERRY, 2004; ORÓÑEZ, 2005).

A maior parte dos queijos são fabricados através da coalhada mista, em que utiliza-se, em maior ou menor quantidade, as características da coalhada lática ou enzimática, dependendo da variedade que está sendo produzida. A coalhada lática predomina na elaboração de queijos moles, por ser frágil, porosa, pouco contraível e difícil de dessorar. Enquanto a enzimática está em maior medida na fabricação de queijos duros, pois é compacta, flexível, impermeável, contraível e fácil de dessorar (ORÓÑEZ, 2005).

Figura 3 - Coagulação ácida e enzimática do leite



Fonte: Cheese in the City (2019)

O *corte da coalhada* é realizado cuidadosamente devido a fragilidade do coágulo, e consiste na separação da coalhada em partes iguais para favorecer a expulsão do soro. Na obtenção de queijos de menor umidade é necessário a formação de grãos pequenos, visto que, quanto menor o tamanho da partícula, maior é a saída de soro, devido ao aumento da área superficial da massa. Contudo evita-se a obtenção de grãos muito pequenos, pois, esses podem ser removidos junto com o soro durante a separação (FRACASSO; PFÜLLER, 2014).

Após a obtenção do ponto da massa, realiza-se a operação de *dessoragem*. Na qual os grãos da coalhada expulsam a fase líquida, denominada soro. A retirada do soro deve ser realizada de forma rápida e eficiente, impedindo possíveis perdas da massa e para controle da acidez. Em seguida, ocorre a *moldagem*, que corresponde a inserção da coalhada em moldes apropriados para produzir a forma característica de cada tipo de queijo. Esses moldes possuem pequenas aberturas para que o soro ainda retido entre os grãos da coalhada seja drenado. Além de ser uma questão de estética, o tamanho do queijo interfere na obtenção de determinadas características específicas. Normalmente os queijos são produzidos em tamanhos e formatos diversos, variando de 250 g até 80 kg (FRACASSO; PFÜLLER, 2014).

A *prensagem* é realizada com a finalidade de proporcionar a separação do soro ainda presente na coalhada, transformando-a em uma massa compacta e com aparência comercial agradável. Os queijos com elevado teor de umidade não passam pela etapa de prensagem,

enquanto os queijos de baixa umidade são prensados com pesos variados conforme o tamanho e a variedade que está sendo fabricada (FOX; MCSWEENEY, 1998 citado por PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009).

A *salga*, etapa efetuada em todas as variedades de queijo em algum momento da produção, é uma operação de grande importância. Visto que o sal tem o objetivo de intensificar o sabor, controlar o desenvolvimento microbiano, regular os processos bioquímicos e físico-químicos. As técnicas de saga mais utilizadas são: no leite, nos queijos recém-fabricados em salmoura, sal à seco na superfície dos queijos ou por adição aos grãos da coalhada. A quantidade de sal adicionado, para a maioria dos queijos, varia de 0,5 a 2,5 % em massa do queijo (LAMPERT; AGNOL, 2019).

A *maturação* é a fase final do processo de produção do alimento, exceto para aqueles consumidos frescos, como a ricota e minas frescal. Essa operação é muito complexa e consiste em uma série de fenômenos físicos, bioquímicos e microbiológicos, que alteram a composição química do produto, principalmente em relação ao conteúdo de açúcares, proteínas e lipídios, e produz as substâncias responsáveis por determinados sabores, texturas e aromas. O processo de maturação consiste em submeter os queijos, durante determinado período (poucas semanas a muitos meses), a determinada temperatura e umidade. Parâmetros que variam conforme o tipo de variedade que se deseja produzir (PERRY, 2004).

Apesar da tecnologia de processamento ser comum a quase todos os tipos de queijo, estima-se que existam em torno de mil variedades do alimento. A fabricação dos numerosos queijos necessita de diferentes operações do leite e da coalhada, alterações na etapa de coagulação e adição do cultivo iniciador, e das condições de maturação, que influenciam de forma significativa na obtenção de determinado tipo de queijo (PERRY, 2004). As variedades do alimento podem ser classificadas segundo diferentes características. Walter e Hargrove (1972), apresentam uma classificação mista dos queijos, Tabela 2, de acordo com a umidade, microrganismos que participam da maturação e seus efeitos.

Tabela 2 - Classificação mista dos queijos

1.	**Queijos Muito Duros** (umidade inferior a 25 %)
	1.1 Maturados por bactérias: Parmesão, Romano.
2.	**Queijos Duros** (umidade de 25 a 36 %)
	2.1 Com buracos. Maturados por bactérias: Emmenthal, Gruyère.
	2.2 Sem buracos. Maturados por bactérias: Cantal, Chedder, Manchego, Catellano, Mohón, Edam, Gouda, Cacicavallo.
3.	**Queijos Semimoles** (umidade de 36 a 40 %)
	3.1 Maturação por bactérias: Gallegos, tipo manchego, St. Paulin, Lancashire.
	3.2 Maturação por bactérias e microrganismos (bactérias e leveduras) superficiais: Limburger, Tilsit, Bel Pasese, Munster. 3.3 Maturação por mofos internos (azuis): Roquefort, Cabrales, Gorgonzola, Stilton, Danablu.
4.	**Queijos Moles** (umidade superior a 40 %)
	4.1 Maturados por mofos artificiais: Camembert, Brie
	4.2 Não-maturados: Mozzarella, Cottage, Burgos, Villalón, Petit Suisse.

Fonte: Ordóñez (2005)

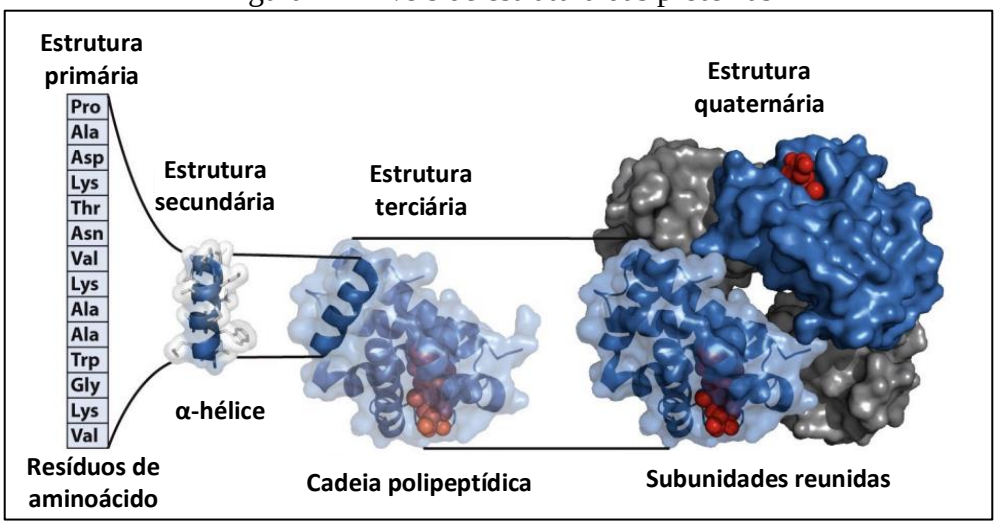
O leite e seus produtos derivados são alimentos demasiadamente consumidos pela população. No entanto, constata-se o crescimento do mercado designado a um grupo de pessoas que, por diferentes razões, buscam produtos alternativos ao leite de vaca e seus derivados. Dentre essas razões, estão os indivíduos que seguem um estilo de vida vegetariano ou vegano e os que apresentam reações adversas ao leite (MACHADO, 2017).

3.4 COAGULAÇÃO DE PROTEÍNAS NA PRODUÇÃO DO QUEIJO

3.4.1 Conceito geral e estrutura de proteínas

As proteínas são polímeros complexos constituídos por 20 aminoácidos distintos conectados, em que cada um possui uma cadeia lateral com características específicas. Essas macromoléculas compõem todos os processos que acontecem nas células, realizando um papel central nos organismos biológicos e com uma imensa variedade de funções. A estrutura das proteínas pode ser caracterizada em quatro níveis de organização: primário, secundário, terciário e quaternário, conforme representado na Figura 4.

Figura 4 - Níveis de estrutura das proteínas



Fonte: Nelson e Cox (2014)

A estrutura primária consiste na sequência linear dos aminoácidos covalentemente unidos através das ligações pépticas. Cada proteína tem um número e uma sequência de aminoácidos particular que determina como a molécula se dobra, influenciando diretamente na formação dos outros níveis estruturais. Além disso, a ordem dos aminoácidos fornece informações das características físicas e químicas da proteína, suas interações com outras moléculas e mecanismos de ação nos organismos vivos. Ao longo da cadeia polipeptídica, os resíduos de aminoácidos formam arranjos espaciais periódicos, denominados de estrutura secundária. Essas estruturas formam-se quando a sequência de resíduos de aminoácidos apresenta o mesmo conjunto de ângulos de torção, sendo as mais conhecidas as α-hélices e conformações β. A estrutura terciária compreende o arranjo tridimensional da proteína, descrevendo o enovelamento de suas estruturas secundárias e posições específicas de cada átomo e cadeias laterais. O arranjo tridimensional determina a função da proteína e é estabilizado através de interações fracas (hidrofóbicas, eletrostáticas, Van der Waals e ligações de hidrogênio) e, algumas vezes, por ligações dissulfeto. Quando uma proteína possui mais de uma cadeia polipeptídica, idênticas ou diferentes, o arranjo dessas subunidades é denominado de estrutura quaternária (NELSON; COX, 2014).

Por meio das diversas interações intramoleculares as proteínas formam um arranjo espacial denominado de conformação. Essas macromoléculas podem assumir diferentes estados conformacionais sem que haja a quebra de suas ligações covalentes. As proteínas dobradas de modo a permitir sua funcionalidade em estado termodinamicamente estável e de menor energia

livre possível, encontram-se em sua conformação nativa (NELSON; COX, 2014; DAMODARAN; PARKIN, 2019).

3.4.2 Desnaturação de proteínas

A desnaturação é um fenômeno responsável por promover a perda da conformação nativa de uma proteína, através de alterações na estrutura secundária, terciária e quaternária, sem a clivagem das ligações peptídicas. Após as modificações, algumas proteínas acabam perdendo completamente seu enovelamento, tornando irreversível o retorno para a conformação nativa, enquanto determinadas moléculas proteicas, conseguem renaturar-se e retornar à uma estrutura funcional. O processo de desnaturação pode ser realizado por diferentes agentes químicos e físicos, que modificam as forças eletrostáticas e hidrofóbicas no interior das proteínas (MORAN, *et al*. 2013; DAMODARAN; PARKIN, 2019). O Quadro 1 apresenta alguns dos principais agentes desnaturantes e seus princípios de atuação.

Quadro 1 - Métodos de desnaturação de proteínas

Fenômeno	Agente desnaturante	Princípio
Físico	Temperatura	Aumenta a entropia (graus de desordem de um sistema) conformacional da proteína, favorecendo a desestabilização das ligações não covalentes que promovem a conformação nativa.
	Pressão hidrostática	O aumento da pressão comprime as moléculas proteicas ocasionando o desdobramento da proteína.
	Cisalhamento	Promove a incorporação de bolhas de ar e a adsorção das proteínas na interface ar-líquido. A diferença de energia livre entre a interface ar-líquido e a fase principal resulta em modificações na estrutura proteica.
Químico	pH	Alteram a carga da molécula proteica, provocando repulsões eletrostáticas intramoleculares e rompimento de algumas ligações de hidrogênio.
	Solventes orgânicos e detergentes	As cadeias apolares das proteínas apresentam maior solubilidade em solventes orgânicos e detergentes e, com isso, interferem nas interações hidrofóbicas que estabilizam a molécula proteica.
	Sais	Promovem efeitos iônicos específicos que influenciam na estabilidade da conformação proteica devido a capacidade de interagirem com a proteína alterando sua hidratação.

Fonte: adaptado de Damodaram e Parkin (2019)

3.4.3 Precipitação de proteínas

A precipitação de proteínas é quando um fenômeno químico ou físico promove a diminuição da interação proteína-solvente e o aumento das interações proteína-proteína. A promoção do contato entre as proteínas forma agregados proteicos insolúveis e de maior peso molecular e, com isso, separam-se da solução e sedimentam. O calor, adição de sais, alterações no pH e solventes orgânicos são alguns dos agentes utilizados para promover a precipitação de proteínas (PESSOA; KILIKIAN; LUCARINI, 2020).

O fenômeno de precipitação não depende da desnaturação proteica. Contudo, a desnaturação das proteínas normalmente promove a precipitação, devido à exposição das superfícies hidrofóbicas que interagem e formam agregados, que normalmente, são altamente desordenados (NELSON; COX, 2014).

3.4.4 Coagulação de proteínas

A coagulação é o processo responsável pela formação de um gel tipo coágulo por meio da transformação das proteínas do estado “sol” (meio dispersante é líquido e a fase dispersa - proteína - é um sólido) para “gel” (fase dispersante é um sólido e a dispersa, um líquido). Esse fenômeno compreende duas etapas: exposição dos grupos funcionais das proteínas dispersas em meio líquido através da desnaturação, e a formação de ligações cruzadas devido às interações covalentes ou não covalentes entre as proteínas desnaturadas, resultando em uma estrutura de rede capaz de aprisionar outros compostos (como a gordura, no caso dos queijos). O produto resultante do processo é caracterizado como um coágulo opaco, irreversível e propenso à sinérese (saída do soro). Diferentes agentes coagulantes podem ser empregados para promover a formação do coágulo. Cátions divalentes como Ca^{2+} e Mg^{2+} promovem a formação de ligações cruzadas entre grupos proteicos negativamente carregados. Alterações no pH promovem a formação dos agregados proteicos devido a mudanças das cargas superficiais e solubilidade das proteínas (DAMODARAN; PARKIN, 2019).

O equilíbrio entre as interações hidrofóbicas atrativas e eletrostáticas repulsivas influencia a aproximação entre proteína-proteína e proteína-solvente no sistema. Quando as interações proteína-proteína são superiores às proteína-solvente é favorável a formação de um precipitado, enquanto, se as interações proteína-solvente prevalecerem provavelmente o sistema não coagulará. Assim, para a formação do coágulo é necessário que a grandeza das

forças hidrofóbicas e hidrofílicas esteja em algum ponto entre esses dois extremos (DAMODARAN; PARKIN, 2019).

3.5 QUEIJO VEGANO

O queijo é um alimento que apresenta uma vasta demanda por estar muito presente na dieta da população, sendo consumido tanto in natura quanto como ingrediente na formulação de diferentes preparos. Segundo uma pesquisa realizada em 2010 pela FIESP, em parceria com o IBOPE, vinte e quatro por cento dos entrevistados responderam que os queijos eram os produtos que mais chamam sua atenção quando são lançados no mercado (CRUZ, *et al.* 2020; FIESP; IBOPE 2010).

Ao mesmo tempo, o aumento no número de indivíduos que apresentam limitações ao consumo de produtos derivados de leite, tanto por questões de saúde, devido às reações adversas ao leite, quanto filosóficas, como veganismo e vegetarianismo, demonstra a necessidade da elaboração de produtos que atendam a esses grupos, e que apresentem propriedades sensoriais semelhantes aos alimentos disponíveis no mercado (SOCIEDADE VEGETARIANA BRASILEIRA, 2021). Uma pesquisa desenvolvida por Taffarel (2012) com 268 participantes que não consomem leite e derivados, revelou que 89 % dos indivíduos apontaram o queijo como o produto que mais sentem falta no mercado.

Segundo a Transparency Market Research (2020), os queijos vegetais vêm ganhando popularidade com o passar dos anos, apresentando uma projeção de crescimento anual de 10%, até 2027. Além disso, a consultoria calcula que até o ano de 2030, o mercado de queijos veganos irá movimentar aproximadamente 7 bilhões de dólares.

O queijo vegano, também chamado de queijo vegetal, é uma categoria de análogo de queijo não lácteo à base de plantas. Esse produto não leva nenhum ingrediente de origem animal em sua composição e busca aproximar-se de algumas propriedades como, sabor, textura, cor e forma do queijo tradicional (SCHINNER, 2012). Os queijos à base de plantas são excelentes alimentos para a saúde humana. Visto que não possuem glúten, apresentam menor teor de gordura e são ricos em proteína e cálcio (AL-SAEDI, 2020).

Dentre os queijos veganos, o mais difundido é o tofu. Esse alimento é produzido através de algumas etapas básicas, em que, primeiramente, é necessário obter o extrato vegetal de soja a partir da lavagem, maceração, trituração dos grãos com água e filtração (separação da parte

líquida do subproduto, chamado de okara). O extrato obtido é coagulado por calor e adição de um coagulante (sais ou ácidos), que formam um gel através da produção de uma rede proteica com retenção de água, lipídios e outros componentes. Por fim, realiza-se o corte do coalho e a etapa de prensagem, ocorrendo a dessoragem da massa e, consequentemente, obtenção do tofu separado do soro (SCHMIDT, 2016).

Embora o tofu seja o análogo de queijo com base vegetal mais consumido, a presença da soja limita sua aceitabilidade. Segundo uma pesquisa desenvolvida por Ciabotti e colaboradores (2007), que avaliou as propriedades sensoriais do tofu com 33 provadores empregando escala hedônica de 9 pontos, o produto apresentou aceitação de 80 %, visto que, o alimento obteve as notas 7,59 para sabor, 7,7 para textura, 7,68 para aparência e 7,99 para coloração. Além disso, o tofu possui características semelhantes apenas ao queijo minas e a ricota, não sendo um produto capaz de substituir os outros tipos de queijo consumidos pela população (TAFFAREL, 2012).

A produção do queijo vegetal pode ser realizada de diferentes formas. Com a combinação de ingredientes, como extratos vegetais, gomas alimentares, temperos, corantes, entre outros, ou por um processo semelhante ao utilizado na produção do queijo de origem animal, através da coagulação dos extratos vegetais. Assim, diversas pesquisas vêm sendo realizadas para o desenvolvimento de queijos veganos a partir de diferentes fontes vegetais e processos produtivos.

Liu e colaboradores (2006) elaboraram um queijo de soja fermentado por bactérias. O alimento foi produzido a partir da coagulação de extrato vegetal de soja por ácido lático, produzido por culturas iniciadoras bacterianas e *Lactobacillus rhamnosus,* e maturação por 30 dias a 10 °C. O produto obtido foi submetido a análise microbiológica, físico-química e sensorial, mostrando que nenhum efeito negativo foi observado e a cultura utilizada é resistente às etapas de processamento do queijo.

Sharma, P., Sharma, D., e Amin (2018) produziram um análogo de queijo vegetal fermentado utilizando amendoim e bactérias probióticas. O alimento foi desenvolvido por meio da produção do extrato vegetal de amendoim e coagulação com aquecimento a 80 °C e cloreto de magnésio em diferentes concentrações. A massa obtida foi dessorada e prensada por 15 minutos. Posteriormente, a cultura de *Lactobacillus rhamnosus* foi inoculada na proporção de 3,75 x 10^{11} UFC para cada 100 g. A coalhada foi fermentada por 24h a 37 °C e armazenada a 4°C durante 15 dias. Os pesquisadores determinaram que a proporção de água e amendoim para

a produção do extrato vegetal de 6:1 é a mais indicada, visto que, a diminuição da quantidade de água favorece a obtenção de um queijo com maior dureza. Além disso, avaliando-se a recuperação de proteínas e sólidos, definiu-se que a concentração ideal de cloreto de magnésio para a coagulação do extrato é de 0,5 %.

Andrade e Seibel (2016) desenvolveram e caracterizaram um queijo do tipo *petit-suisse* (queijo francês com consistência de creme com sabor doce e suave) de base vegetal. O queijo foi desenvolvido através da homogeneização de um coágulo de extrato de soja, obtido por meio de coagulação ácida com ácido lático, polpa de fruta congelada de maracujá e morango, açúcar, corante artificial, aromatizante artificial e um mix de goma guar e xantana. Os dois produtos foram analisados físico-quimicamente e sensorialmente. O queijo sabor maracujá apresentou o valor médio de 6,41 para aceitação global e umidade de 67,59 %. Enquanto, o de sabor morango obteve nota de 6,01 para aceitação global e 68,71 % de umidade.

Um queijo de soja com 61,5 % de umidade média, 21,8 % de proteína bruta e 2,6 % de gordura foi elaborado por Chumchuere, MacDougall e Robinson (2000). A produção do produto deu-se através da reconstituição de leite de soja em pó e coagulação por ação de culturas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus fermentum*, adicionadas ao extrato a uma taxa de 2,5 % cada e incubadas por 16h a 37 °C. O estudo também realizou testes para investigar os efeitos da adição de sulfato de cálcio na mistura coalhada-soro para contribuir com o processo de endurecimento do queijo. Contudo, a incorporação do produto não apresentou diferenças significativas.

Al-Saedi (2020) produziu queijo de tremoço, identificando através de análises de rendimento e sensorial, a temperatura ideal de produção do extrato vegetal e diferentes agentes de coagulação, sendo eles: limão, vinagre, cultura de bactérias (*Lactococcus lactis* e *Lactococcus cremoris*) e coalho vegetal. O estudo concluiu que o queijo obtido a partir dos grãos moídos com água a 45 °C e utilização do vinagre (ácido acético) como coagulante, apresentaram maior rendimento, teor de proteínas e preferência na análise sensorial.

Cruz, Ribeiro e Oliveira (2020) desenvolveram um produto tipo requeijão à base de amendoim. No estudo o extrato de amendoim produzido foi aquecido até a temperatura de 100°C e submetido a coagulação ácida através da adição de suco de limão (2,4 % p/p). Após 4 horas o coágulo foi dessorado e prensado por 12 horas. O alimento passou por análise sensorial, apresentando resultados satisfatórios e com significativo percentual de intenção de compra,

visto que, 43% dos avaliadores afirmaram que certamente comprariam o produto, enquanto, 27% provavelmente comprariam.

3.6 PRODUÇÃO DO QUEIJO VEGETAL DE CASTANHA-DE-CAJU

Os análogos de queijo à base de castanha-de-caju, podem ser produzidos a partir de uma metodologia semelhante à empregada na fabricação de queijos de origem animal. A produção apresenta duas etapas principais: a obtenção do extrato vegetal hidrossolúvel, através da maceração da castanha-de-caju e filtração para remoção dos sólidos insolúveis; e produção do queijo vegetal por meio dos processos de coagulação do extrato, dessoragem, moldagem, salga e maturação.

Oyeyinka, Odukaya e Adebayo (2019) avaliaram a composição nutricional e aceitabilidade de queijos análogos produzidos a partir de extrato vegetal de castanha-de-caju e soja. As misturas de leite vegetal foram preparadas substituindo o extrato de soja pelo de castanha-de-caju em diferentes proporções de 0, 20, 40, 60, 80 e 100%, que posteriormente foram coaguladas com alúmen, dessoradas e cortadas. Como resultado, o queijo produzido com 40 % de extrato de castanha-de-caju apresentou maior aceitabilidade em termos de sabor, cor e aceitação global. Além disso, dispôs de maior teor de proteínas (69,99 %) e cinzas (18,76 %).

Tabanelli e colaboradores (2018) caracterizaram um produto fermentado vegano obtido a partir da castanha-de-caju. Além disso, realizaram a identificação das bactérias responsáveis pelo processo de fermentação espontânea, selecionando algumas cepas para a realização da fermentação em escala piloto. O produto foi desenvolvido através da moagem da castanha-de-caju com água na proporção de 40 % p/v para a obtenção de um creme homogêneo. O creme foi disposto em temperatura ambiente por 48 h para a fermentação espontânea e, posteriormente, moldado e armazenado em temperatura refrigerada por 20 dias. Os resultados e as cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus* e *Weissella sp.* obtidos com a caracterização do queijo foram utilizados para um estudo em escala piloto.

3.6.1 Castanha-de-Caju

O cajueiro (*Anacardium occidentale Linaeus*), da família Anacardiacea, é uma árvore de clima tropical originalmente brasileira. Especificamente do litoral nordestino, essa planta passou a ser cultivada em diversos países da África, Ásia e Europa (OLAYINKA *et al*. 2018).

O fruto do cajueiro é formado pela castanha-de-caju, verdadeiro fruto, e pelo pedúnculo hipertrofiado, pseudofruto, Figura 5. A castanha é um aquênio reniforme constituído de três partes: casca, película e amêndoa (parte comestível, formada por dois cotilédones de cor marfim) (PAIVA, GARRUTTI; DA SILVA NETO, 2000).

A amêndoa do caju é um excelente alimento, sendo considerada fonte de proteína (20 a 24 g/100g), carboidratos (23 a 25 g/100g) e gorduras (40 a 57 g/100g). Além disso, a castanha é rica em minerais que atuam como cofatores que auxiliam na regulação das funções metabólicas do organismo, como cálcio, ferro, fósforo, manganês, cobre, arsênio e selênio (SOARES *et al*. 2012; OLAYINKA *et al*. 2018). A castanha-de-caju pode ser consumida de forma seca ou como ingrediente culinário, sendo a terceira noz mais consumida no mundo (BARBOZA, *et al*. 2019). E com produção mundial de 4,9 milhões de toneladas por ano (DANTAS, 2020).

Figura 5 - Castanha-de-caju e pedúnculo

Fonte: Campos (2018)

As propriedades funcionais das proteínas, como gelificação e emulsificação, são diretamente influenciadas por sua solubilidade, propriedade relacionada ao equilíbrio entre interações proteína-proteína e solvente-solvente. Liu e colaboradores (2018), por meio do método de Lowry com pequenas modificações, observaram que as proteínas da castanha-de-caju apresentam solubilidade mínima em faixa de pH 3,0 a 5,0 e solubilidade máxima em pH 9,0. Além disso, ao submeterem as proteínas da oleaginosa a testes moleculares e funcionais,

os pesquisadores constataram que além de uma ótima fonte nutricional, a castanha-de-caju possui proteínas de alto potencial para serem utilizadas na indústria de alimentos.

3.6.1.1 Extrato de Castanha-de-Caju

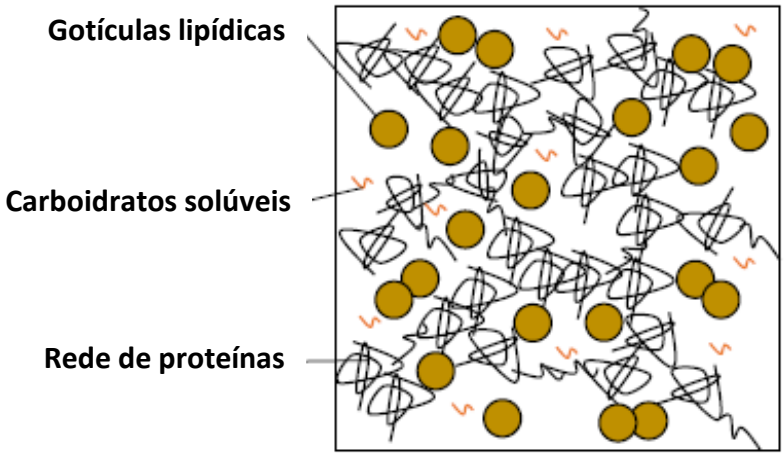
Os extratos hidrossolúveis vegetais, popularmente conhecidos como “leites vegetais”, são bebidas produzidas à base de plantas, como soja, coco, amendoim, aveia, arroz e castanhas. Esse alimento possui características físico-químicas e sensoriais análogas às do leite. Com isso pode ser utilizado como uma alternativa ao leite in natura e substituto culinário na produção de bolos, queijos, iogurtes e outras preparações (BAYER, 2019).

Segundo a Resolução n° 268/2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2005) extratos vegetais são:

> Produtos proteicos de origem vegetal obtidos a partir de partes proteicas de espécie(s) vegetal(is), podendo ser apresentados em grânulos, pó, líquido ou outras formas com exceção daqueles não convencionais para alimentos. Podem ser adicionados de outros ingredientes, desde que não descaracterizem o produto.

O processo de produção do extrato vegetal é baseado em cinco etapas fundamentais: lavagem, maceração e trituração da base vegetal com água, filtração para separação do resíduo insolúvel e tratamento térmico. Contudo o processo pode sofrer modificações dependendo da matéria-prima escolhida e características finais do produto (BERNAT, *et al.* 2014). Os extratos vegetais são dispersões coloidais diluídas, Figura 6, obtidas com a trituração do material vegetal e remoção das partículas insolúveis (GROSSMANN; MCCLEMENTS, 2021).

Figura 6 - Dispersão coloidal diluída com base vegetal



Fonte: Grossmann e McClements (2021)

O “leite vegetal” de castanha-de-caju, tornou-se uma das alternativas para a substituição do leite animal e para a produção de substitutos lácteos, como o queijo. Estima-se que o mercado de extrato vegetal da amêndoa de caju cresça a uma taxa de 18% ao ano, chegando a US $268 milhões em 2024 (INSTITUTO CAJU BRASIL, 2019).

A composição centesimal do extrato vegetal depende da forma de preparação e a proporção de castanha-de-caju e água utilizada. Cardoso (2016), através da trituração de amêndoas de caju com água, na proporção de 1:2 (p/v), obteve um extrato vegetal com 80,73% de umidade, 4,03 % de proteína e 8,92 % de lipídios. Enquanto, Dantas (2020), desenvolveu extrato de castanha-de-caju através da trituração de amêndoas de caju torradas e quebradas com água mineral na proporção de 1:6 (p/v). No qual, adicionou-se sal e açúcar demerara nas respectivas porcentagens, 5,65 e 0,13 %. O produto obtido foi submetido a análises para a determinação da composição centesimal, apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição centesimal de extrato de castanha-de-caju

Umidade	82,24 %
Cinzas	0,06 %
Proteínas	3,26 %
Lipídios	7,05 %
Carboidratos	6,39 %

Fonte: Dantas (2020)

3.6.2 Coagulação do extrato vegetal

Apesar das proteínas vegetais apresentam um comportamento de coagulação diferente das micelas de caseína presentes no leite, devido às suas diferentes estruturas químicas de superfície, o processo de coagulação dos extratos vegetais para a elaboração de um produto análogo, pode ser realizada de forma semelhante à do queijo. No qual, normalmente, utiliza-se ácido cítrico, ácido acético, ácido lático ou sais de cálcio ou magnésio (GROSSMANN; MCCLEMENTS, 2021).

A obtenção da coalhada a partir do extrato vegetal, na maior parte dos estudos, é conseguida através da combinação de tratamento térmico e posterior adição de um agente coagulante. Visto que o aquecimento térmico provoca o desdobramento das moléculas de

proteína, permitindo a exposição de grupos sulfidrila, ligações dissulfeto e cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos. Com isso, o agente coagulante adicionado consegue promover a interação entre as cadeias proteicas, resultado na formação de uma matriz com estrutura tridimensional de proteínas que retém lipídios, água e outras moléculas presentes no extrato vegetal (LIU *et al*., 2006; BENASSI; PRUDENCIO, 2013).

A coagulação através de sais promove a neutralização das cargas negativas das proteínas devido a união de íons positivos, tornando as interações proteína-proteína mais fortes e, consequentemente, formando agregados que precipitam. Enquanto, a coagulação ácida envolve a diminuição da solubilidade das proteínas através da redução do pH e aproximação do ponto isoelétrico (valor de pH em que a molécula apresenta carga elétrica igual a zero) que promove a aproximação das moléculas (SCHMIDT, 2016).

3.6.3 Microbiota dos queijos

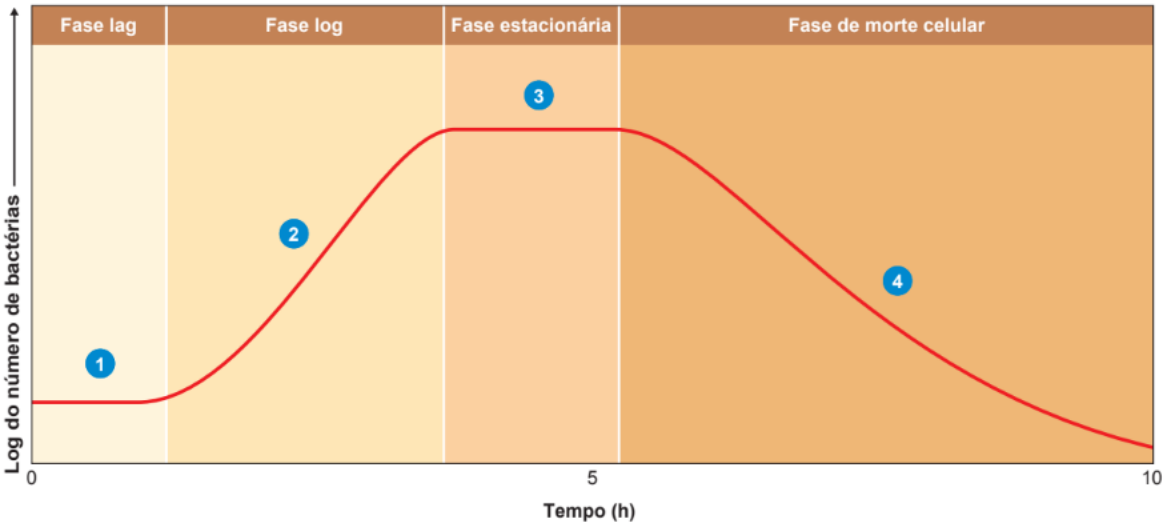
Os queijos podem ser produzidos a partir do leite cru ou pasteurizado. A utilização do leite cru é permitida apenas quando o processo de maturação dura no mínimo 60 dias a temperaturas superiores a 5 °C, e a fabricação do alimento é realizada a partir dos microrganismos endógenos do leite. No caso do emprego da etapa de pasteurização, a microbiota do leite sofre modificações. Assim, torna-se necessário a adição de microrganismos exógenos, para que ocorra as etapas de coagulação e maturação. Processo que permite o acréscimo de microrganismos selecionados e que fornecerão as características desejadas ao produto. Como é o caso da variedade Camembert, um queijo de mofo branco e massa mole, acidificado através de *Lactococcus lactis* e *Lactococcus cremoris* e maturado com o fungo *Penicillium camemberti*. (ORÓÑEZ, 2005)

Os microrganismos são de grande importância para a produção de queijos, podendo ser classificados em culturas iniciadoras ou secundárias. As culturas iniciadoras, compostas por bactérias ácido-láticas, são utilizadas na etapa de coagulação. Visto que, através do processo de fermentação e, consequentemente, produção de ácido lático, ocorre a acidificação do leite. Além disso, auxiliam na obtenção das propriedades organolépticas, valor nutricional e qualidade microbiológica. As bactérias mais utilizadas como cultura *starter* são: *Lactococcus lactis sp lactis*, *Lactococcus lactis sp cremoris*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus sp*. As culturas secundárias, compostas por bactérias, fungos e leveduras, podem apresentar características probióticas e estão predominantes durante o processo de maturação. Assim,

influenciam diretamente na obtenção das características sensoriais do produto e na variedade de queijos existentes (CROW *et al*., 1993 citado por ROSA, 2005). A etapa de maturação é responsável por promover modificações bioquímicas devido a sintetização de determinados compostos pela microbiota presente, que determinarão as propriedades de aroma, textura e sabor do produto (PRETTO; SANT'ANNA, 2017).

A propagação das bactérias segue a curva de crescimento microbiano, Figura 7, dividida em quatro fases básicas de crescimento: fase lag, fase log, fase estacionária e de morte celular.

Figura 7 - Curva de crescimento microbiano



Fonte: Tortora, Funke e Case (2012)

Na primeira etapa do processo de crescimento, a fase lag, as bactérias apresentam excessiva atividade metabólica para preparação do crescimento populacional, ocorrendo pouca ou nenhuma divisão celular. Após essa etapa de adaptação, as células entram na fase log, momento de maior atividade metabólica, iniciando o processo de divisão celular e aumento logarítmico ou exponencial da população. Enquanto na fase estacionária, o processo de reprodução diminui ocorrendo a estabilização da população, visto que, o número de células mortas torna-se igual ao número de células novas. Esse conjunto de células pode entrar na fase estacionária devido a diferentes fatores, como o término dos nutrientes e mudanças de pH. Por fim, ocorre a fase de morte celular e a população é reduzida em uma taxa logarítmica, pois a proporção de morte celular excede a geração de novas células. Essa etapa pode acontecer até que a quantidade de células tenha diminuído para uma pequena parcela ou tenha morrido completamente (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

3.7 ALIMENTOS PROBIÓTICOS

Com o aumento da busca por um estilo de vida saudável, a população apresenta interesse em consumir alimentos de maior valor nutricional e com componentes funcionais (VECCHIO; VAN LOO; ANNUNZIATA, 2016). Em relação ao consumo mundial de alimentos saudáveis, o Brasil está em quarto lugar com movimento anual de US$ 35 bilhões. Com destaque para os alimentos funcionais que apresentam uma taxa de 8 a 14 % de crescimento anual (STRATTON, *et al*. 2015; CARREIRO, 2019).

Os alimentos funcionais são aqueles que possuem a capacidade de promover a saúde por meio de recursos não observados na nutrição convencional e podem ser produzidos através de determinados componentes alimentares (SANDERS, 1998). Dentre os principais aditivos funcionais encontram-se os probióticos, definidos como microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando consumidos em doses adequadas (FULLER, 1989). A partir desses microrganismos são produzidos os alimentos probióticos, que enquadram-se dentro da categoria de alimentos funcionais por fornecerem benefícios à saúde, auxiliando na prevenção e combate a doenças (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Tendo em vista os benefícios dessa categoria de alimentos, a indústria de laticínios tem acrescentado culturas probióticas para proporcionar propriedades funcionais aos produtos, principalmente na produção de iogurtes e leites fermentados (SAAD, 2006). Determinadas bactérias são empregadas na produção de alimentos, pois além de contribuírem para o desenvolvimento do produto, influenciam positivamente na saúde do hospedeiro. Sendo as do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* as culturas mais utilizadas como probióticos.

Segundo Almeida (2017) em resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA 2008, recomenda-se uma ingestão diária mínima de 10^8 – 10^9 UFC. Sendo necessário que o alimento probiótico disponha de microrganismos vivos e ativos em uma quantidade capaz de suprir a dose diária. Enquanto Kurmann e Rasic (1991), afirmam que os alimentos probióticos necessitam apresentar uma concentração mínima de 10^6 – 10^7 UFC por grama do produto para fornecerem benefícios à saúde.

3.7.1 *Bacillus clausii*

O *Bacillus clausii* é uma espécie do filo Firmicutes, classe Bacilli e ordem Bacillaes. Essa bactéria consiste em um bacilo Gram-positivo e formador de esporos, podendo ser

encontrada no solo, água e ar. Sua reprodução acontece na faixa de temperatura de 15-50 °C e pH ótimo de 8, apresentando uma tolerância salina de até 10 % de NaCl. Além disso, o *B. clausii* produz uma classe de enzimas proteases denominadas de subtilisinas (NIELSEN; FRITZE; PRIEST, 1995; HECHT, 1999). Essa espécie é considerada um microrganismo probiótico, pois quando administrada em quantidades apropriadas é capaz de estabelecer relações simbióticas com o organismo hospedeiro, proporcionando benefícios à saúde (URDACI; BRESSOLLLIER; PINCHUK, 2004).

Por apresentar atividade antimicrobiana, imunológica, regulação da proliferação celular e proteção intestinal, a ingestão de *Bacillus clausii* oferece muitos benefícios à saúde humana. As cepas dessa bactéria produzem clausina, um composto antimicrobiano que atua contra bactérias Gram-positivas, especialmente *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* e *Clostridium difficile*. (URDACI; BRESSOLLLIER; PINCHUK, 2004; LEPETUSO *et al.*, 2016). Segundo Salvetti e colaboradores (2003), além de atuar como probiótico, essa espécie é capaz de secretar riboflavina, mais conhecida como vitamina B2, de grande importância para o bom funcionamento e crescimento celular. Santos D., Amêndola e Santos S. (2019) citam que em estudo do emprego de *Bacillus clausii* na prevenção de infecções respiratórias com crianças, Marseglia e colaboradores (2007), observaram que os indivíduos que consumiram leite acrescido de *B. clausii* apresentaram redução das infecções em comparação ao grupo controle.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INÓCULO

A bactéria *Bacillus clausii* foi obtida por meio do medicamento Enterogermina® (Sanofi), uma suspensão composta de 2 x 10^9 UFC/5mL. Visto que o microrganismo se encontrava em suspensão, não foi realizada a propagação da cultura, sendo diretamente inoculada no coalho para o desenvolvimento da etapa de fermentação.

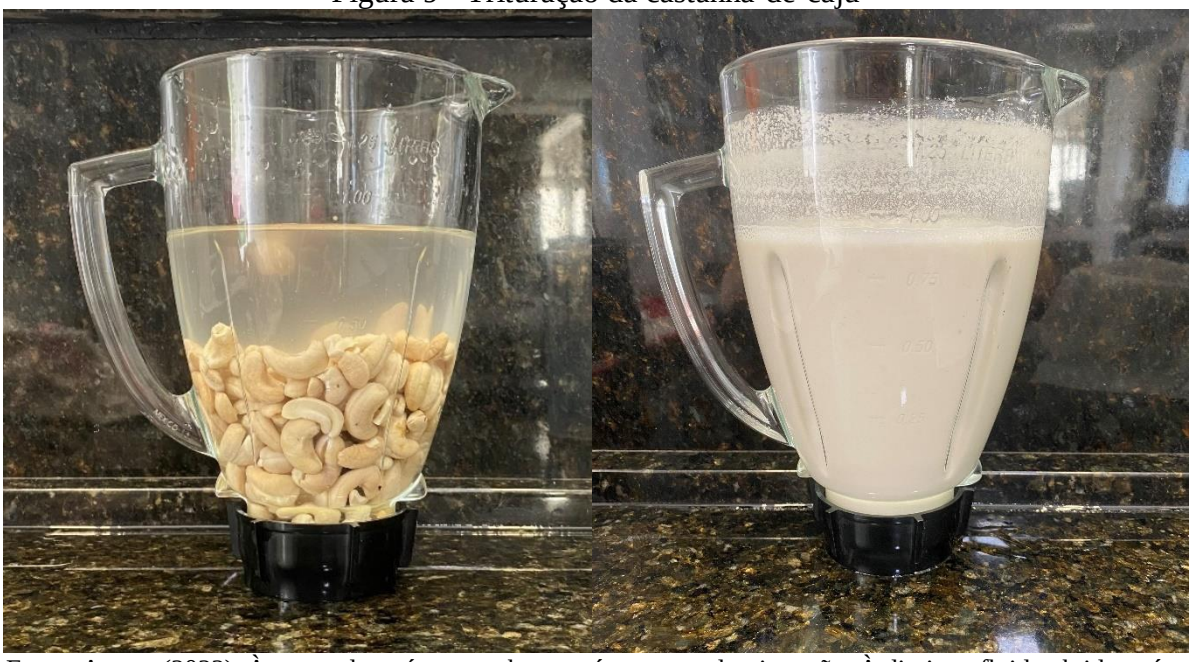
4.2 ELABORAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL DE CASTANHA-DE-CAJU

O extrato vegetal hidrossolúvel de castanha-de-caju foi desenvolvido através da metodologia proposta por Cruz, Ribeiro e Oliveira (2020) com modificações. O processo de elaboração do extrato iniciou com a hidratação das castanhas cruas (500 g) em 1500 mL de água mineral por 4 h, conforme Figura 8. A água da maceração foi descartada e os grãos lavados em água corrente. Em seguida, triturou-se os grãos em liquidificador doméstico com 1722 mL de água mineral a temperatura ambiente, obtendo-se uma proporção final de 22,5 % (m/m), Figura 9. Após a trituração, o fluido obtido passou por uma etapa de filtração em tecido tipo *voil* para separação do extrato vegetal dos resíduos sólidos insolúveis, Figura 10. O filtrado foi acondicionado em garrafas e armazenado sob refrigeração em geladeira até o início dos testes de coagulação e produção do análogo de queijo.

Figura 8 - Castanha-de-caju crua e hidratada

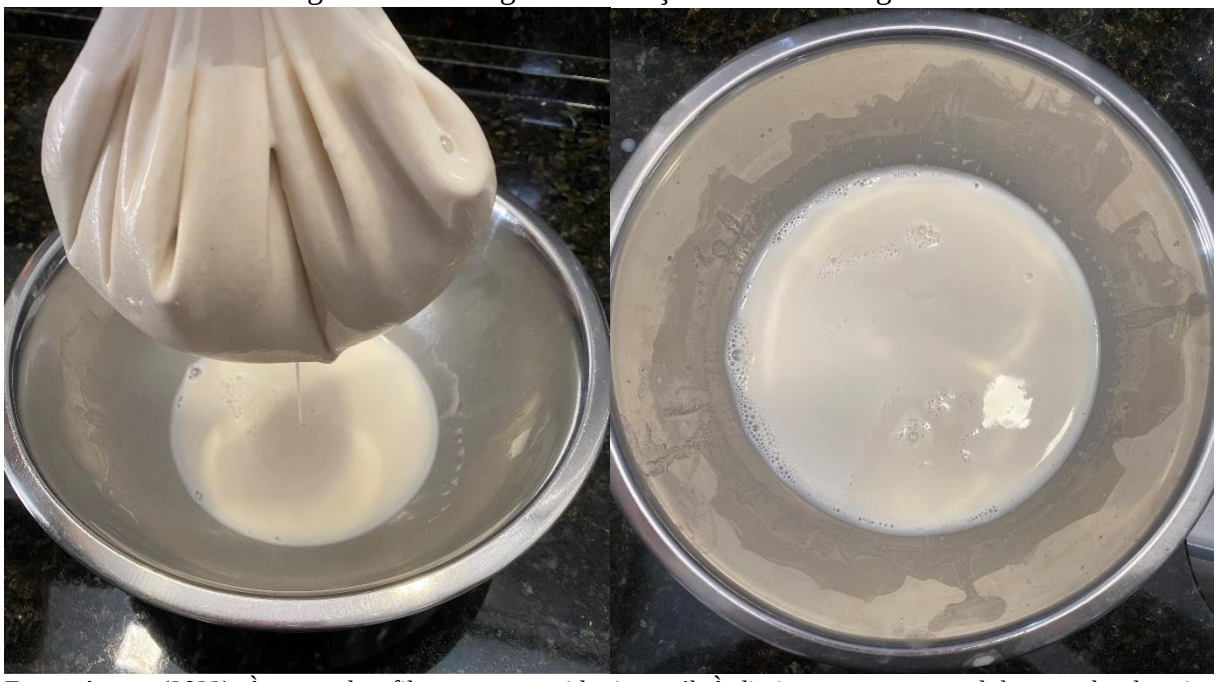
Fonte: Autora (2022). À esquerda a castanha-de-caju crua. À direita a castanha hidratada em água após 4 horas.

Figura 9 - Trituração da castanha-de-caju



Fonte: Autora (2022). À esquerda está a castanha com água antes da trituração. À direita o fluido obtido após a trituração.

Figura 10 - Filtragem e obtenção do extrato vegetal



Fonte: Autora (2022). À esquerda a filtragem em tecido tipo *voil*. À direita o extrato vegetal de castanha-de-caju.

4.3 AVALIAÇÃO DA COAGULAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL

4.3.1 Tratamentos individuais para coagulação do extrato proteico

Diferentes tratamentos foram testados individualmente para avaliar o seu efeito sobre a coagulação proteica do extrato vegetal de castanha-de-caju. Os tratamentos foram realizados em triplicata e consistiram em calor 80 °C, calor de 127 °C e pressão de 1,5 kgf/cm^2, adição de sais (NaCl ou $MgSO_4$ em concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 %) e ajuste do pH (3, 4 ou 5) com Ácido Acético ou Ácido Cítrico, conforme segue:

Calor de 80 ºC: 10 mL de extrato vegetal foram adicionados em tubos Falcon de 15 mL e mantidos por 15 minutos em banho-maria a 80°C.

Calor de 127 ºC (pressão de 1,5 kgf/cm^2): 10 mL de extrato vegetal foram adicionados em tubos Falcon de 15 mL e aquecidos em autoclave a 127 °C durante 15 minutos. Como o extrato vegetal foi aquecido à 127°C em autoclave, que para atingir essa temperatura chega a uma pressão de 1,5 kgf/cm^2 (1,452 atm), esse tratamento engloba tanto o aquecimento do extrato vegetal quanto o aumento da pressão do sistema.

Adição de sais: Cloreto de Sódio (NaCl) ou Sulfato de Magnésio ($MgSO_4$) foram adicionados a 10mL de extrato vegetal, presentes em tubos Falcon de 15mL, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 % (m/v) cada.

Ácido: volumes de 50 mL do extrato vegetal tiveram seus pHs ajustados para 3, 4 ou 5, em pHmetro, através da adição de Ácido Acético 4 M ou Ácido Cítrico 1 M. Posteriormente, transferiu-se 10 mL para tubos Falcon de 15 mL.

Após a coagulação, todos os tubos Falcon foram deixados em repouso por 12 h e centrifugados a 4500 rpm por 5 min, para separação do soro.

Para facilitar a organização, os tubos foram numerados de 1 a 14, de acordo com o Quadro 2, que relaciona o número ao tratamento realizado em cada tubo.

Quadro 2 - Números dos tubos e métodos de coagulação testados

N°	Calor °C		Adição de Sais						pH					
	80	127 1,5kgf/cm^2	NaCl (% m/v)			$MgSO_4$ (% m/v)			Ácido Acético			Ácido Cítrico		
			0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	3,0	4,0	5,0
1	X													
2		X												
3			X											
4				X										
5					X									
6						X								
7							X							
8								X						
9											X			
10										X				
11									X					
12														X
13													X	
14												X		

Fonte: Autora (2022)

4.3.2 Combinação de diferentes tratamentos para coagulação do extrato proteico

Os diferentes métodos de coagulação foram testados de forma combinada para avaliar um possível efeito sinérgico ou inibitório sobre a coagulação das proteínas do extrato vegetal. A combinação de calor e diferentes concentrações de sais geraram os tubos 15 a 26, conforme Quadro 3, demonstrado abaixo:

Quadro 3 - Combinação de calor e sais para a coagulação

(continua)

N°	Calor °C		Adição de Sais					
	80	127 1,5kgf/cm^2	NaCl (% m/v)			$MgSO_4$ (% m/v)		
			0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0
15	X		X					
16	X			X				
17	X				X			
18	X					X		
19	X						X	
20	X							X
21		X	X					
22		X		X				

(conclusão)

N°	Calor °C		Adição de Sais					
	80	127 1,5kgf/cm^2	NaCl (% m/v)			$MgSO_4$ (% m/v)		
			0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0
23		**X**			**X**			
24		**X**				**X**		
25		**X**					**X**	
26		**X**						**X**

Fonte: Autora (2022)

Da mesma forma, a combinação de calor com acidificação por Ácido Acético e Ácido Cítrico gerou um novo conjunto de tubos numerados de 27 a 38, conforme pode ser observado no Quadro 4. Diferente do restante dos tratamentos, os com ácido e calor utilizou-se 5mL de extrato vegetal. O menor volume deu-se em razão do aumento do volume do mesmo quando aquecido, que ultrapassou a capacidade do tubo quando foram utilizados os 10mL iniciais.

Quadro 4 - Combinação de calor e acidificação por Ácido Acético e Ácido Cítrico para a coagulação

N°	Calor °C		pH					
	80	127 1,5kgf/cm^2	Ácido Acético			Ácido Cítrico		
			5,0	4,0	3,0	5,0	4,0	3,0
27	**X**		**X**					
28	**X**			**X**				
29	**X**				**X**			
30		**X**	**X**					
31		**X**		**X**				
32		**X**			**X**			
33	**X**					**X**		
34	**X**						**X**	
35	**X**							**X**
36		**X**				**X**		
37		**X**					**X**	
38		**X**						**X**

Fonte: Autora (2022)

Dando continuidade às possibilidades de combinações entre os diferentes agentes coagulantes, foram gerados os tubos 39 a 74 quando diferentes concentrações de sais e ajuste de pH com Ácido Acético ou Ácido Cítrico foram utilizados juntamente, conforme observado no Quadro 5.

Quadro 5 - Combinação de diferentes concentrações de sais e ajustes de pH com Ácido Acético ou Ácido Cítrico

N°	Adição de Sais						pH					
	NaCl (% m/v)			$MgSO_4$ (% m/v)			Ácido Acético			Ácido Cítrico		
	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	3,0	4,0	5,0
39	X								X			
40		X							X			
41			X						X			
42	X							X				
43		X						X				
44			X					X				
45	X						X					
46		X					X					
47			X				X					
48				X					X			
49					X				X			
50						X			X			
51				X				X				
52					X			X				
53						X		X				
54				X			X					
55					X		X					
56						X	X					
57	X											X
58		X										X
59			X									X
60	X										X	
61		X									X	
62			X								X	
63	X									X		
64		X								X		
65			X							X		
66				X								X
67					X							X
68						X						X
69				X							X	
70					X						X	
71						X					X	
72				X						X		
73					X					X		
74						X				X		

Fonte: Autora (2022)

4.4 ANÁLISE DA QUALIDADE DOS COÁGULOS

Os coágulos obtidos foram analisados conforme aspecto visual, aparência do soro e porcentagem de coagulação proteica, conforme descrito na 4.6.4. O tratamento que demonstrou melhor resultado nos aspectos avaliados foi escolhido para ser utilizado na elaboração do análogo de queijo à base de castanha-de-caju. Visto que é importante que a coalhada apresente as seguintes características: coagulação proteica adequada, consistência gelatinosa e firme, formação de soro límpido, grãos de tamanho adequado para facilitar a dessora e massa homogênea com baixa permeabilidade, para favorecer a inoculação do microrganismo probiótico.

4.5 ELABORAÇÃO DO QUEIJO VEGETAL

O análogo de queijo à base de castanha-de-caju foi elaborado a partir dos resultados obtidos na avaliação da coagulação do extrato: pH 5 ajustado com Ácido Cítrico 1 M e aquecimento a 127 ºC em autoclave à 1,5 kgf/cm^2 por 30 minutos.

4.5.1 Coagulação do extrato vegetal

O extrato vegetal de castanha-de-caju (2050 mL) foi acondicionado em copos de Becker de 1000 mL e teve seu pH ajustado para 5 através da adição de 16,65 mL Acido Cítrico 1 M em pHmetro. Posteriormente, o extrato foi transferido para frascos de reagente de 500 mL com tampa entreaberta e aquecido em autoclave à 1,5 kgf/cm^2 e 127 °C por 30 minutos, seguido por tempo de espera de 1 h para completa coagulação, conforme Figura 11.

Figura 11 - Coagulação do extrato vegetal

Fonte: Autora (2022)

4.5.2 Dessora do coágulo

A partir desta etapa, todo o procedimento foi realizado em cabine de fluxo laminar vertical com a finalidade de evitar a contaminação do produto. Da mesma forma, todos os materiais utilizados foram previamente autoclavados.

O coágulo obtido foi dessorado por 3 h em peneira metálica de cozinha com tecido específico para dessoragem de queijo, denominado de tecido volta ao mundo e adquirido em mercado local, conforme Figura 12, e separado em duas porções.

Figura 12 - Dessoragem do coágulo

Fonte: Autora (2022)

4.5.3 Inoculação e moldagem do coágulo

O coágulo dessorado foi separado em duas porções. A primeira porção de 650 g foi dividida em três porções menores de igual peso e colocadas em moldes plásticos perfurados revestidos internamente com tecido de dessoragem. Por não terem sido inoculados com o microrganismo, estes queijos vegetais foram considerados controle para a quantificação microbiana realizada posteriormente.

A segunda porção de 650 g da coalhada foi inoculada diretamente com a bactéria *Bacillus clausii* (Enterogermina®) na proporção de 2 x 10^9 UFC para cada 100 g de coalho. O coalho inoculado foi dividido igualmente em três moldes plásticos perfurados revestidos internamente com tecido de dessoragem conforme Figura 13.

Figura 13 - Moldagem e fermentação dos coágulos

Fonte: Autora (2022)

4.5.4 Fermentação

Os queijos já moldados, inoculados ou não, permaneceram em temperatura ambiente por 24 h em câmara de fluxo laminar e seguiu para refrigeração a 10 ºC por mais 48 h para finalizar a fermentação.

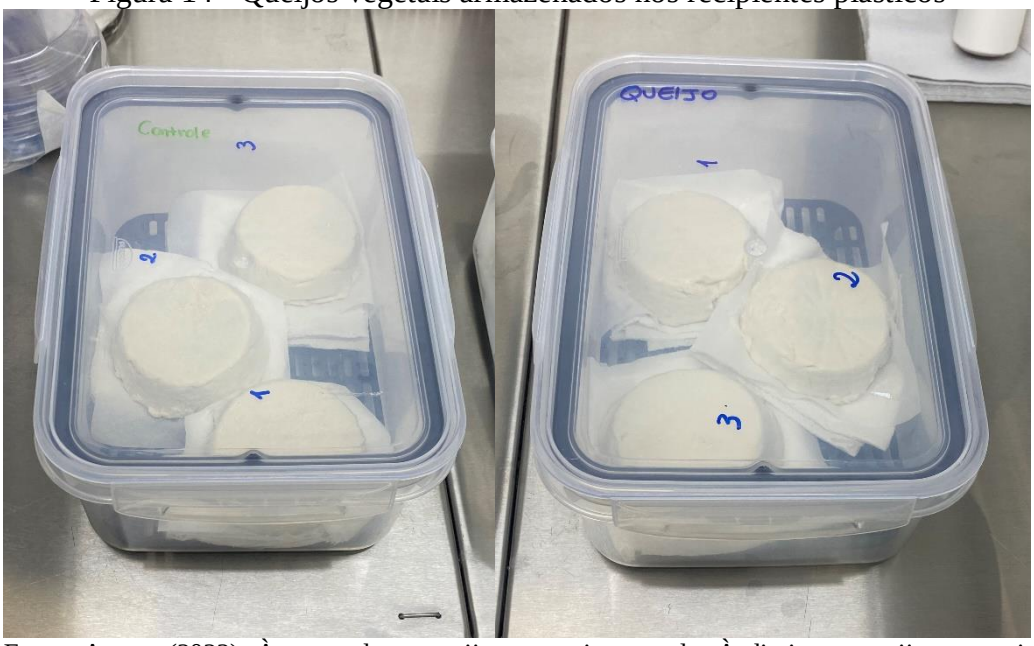
4.5.5 Prensagem

Após a fermentação, realizou-se a prensagem dos queijos com peso de 600 g sobre cada amostra por 5 h para auxiliar na remoção do soro.

4.5.6 Salga

Os queijos vegetais foram submetidos à salga por aplicação de NaCl, aproximadamente 1 g, na superfície externa e acondicionados na refrigeração a 10 ºC em recipientes plásticos fechados, conforme Figura 14.

Figura 14 - Queijos vegetais armazenados nos recipientes plásticos



Fonte: Autora (2022). À esquerda os queijos vegetais controle. À direita os queijos vegetais probióticos.

4.6 ANÁLISE DO QUEIJO VEGETAL

4.6.1 Análise microbiológica

O extrato e queijos vegetais produzidos foram analisados microbiologicamente por contagem de microrganismos viáveis em placa, mediante as técnicas de diluição em série e espalhamento em placa, conforme descrito por Tortora, Funke e Case (2012). Após as diluições do extrato vegetal e do queijo vegetal (descritas abaixo) uma alíquota de 50 µL de cada diluição foi pipetada em placa de Petri contendo meio ágar padrão para a contagem (PCA) solidificado. Espalhou-se o líquido de forma uniforme por toda a superfície do meio com alça de Drigalsky. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 48 h. Após a incubação, para cada amostra, selecionou-se a diluição que continha entre 25 e 250 Unidades Formadoras de Colônia. O número de microrganismos viáveis presentes na amostra foi determinado através da Equação 1.

$$N° \ de \ UFC = \frac{N° \ de \ colônias \ x \ fator \ de \ diluição}{volume \ utilizado \ no \ plaqueamento} x \frac{volume \ de \ homogeneização}{peso \ da \ amostra} \quad (1)$$

Os resultados foram expressos em UFC/g.

4.6.1.1 Análise microbiológica do extrato vegetal

Foram preparadas diluições graduais a partir de 1,0 mL do extrato vegetal a um fator de diluição de 10 vezes até chegar à diluição 10^{-10}. Posteriormente, 50 µL das diluições 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} e 10^{-10} foram inoculados nas placas de Petry.

4.6.1.2 Análise microbiológica dos queijos vegetais

As análises para os queijos vegetais ocorreram em 16, 24 e 72 h de fermentação. Em cada tempo, 5 g de cada queijo foram inicialmente diluídos e homogeneizados em 45 mL de solução salina estéril NaCl 0,9 %, sendo está a diluição 10^{0}. A diluição 10^{-1} foi obtida através da transferência de 1 mL da amostra 10^{0} para um tubo contendo 9 mL de solução salina. Acrescentou-se 1 mL da diluição 10^{-1} em outro tubo com 9 mL de solução salina, resultando na diluição 10^{-2}. Esse processo foi repetido até a obtenção da diluição 10^{-6}.

Juntamente com o plaqueamento das diluições, preparou-se quatro placas controle. Com o intuito de verificar possíveis contaminações, duas placas continham apenas o meio PCA solidificado. Enquanto as outras placas foram inoculadas com 10 e 50 µL de Enterogermina®, para avaliação da morfologia e crescimento das colônias de *Bacillus clausii*.

4.6.2 Rendimento

O rendimento na produção do queijo vegetal foi determinado de duas maneiras. Conforme Equação 2 apresentada por Al-Saedi (2020) e através da massa de produto obtido a partir de 100 g de grão como Ciabotti (2004), representado na Equação 3.

$$Rendimento\ (\%) = \frac{massa\ da\ coalhada}{volume\ do\ extrato\ vegetal} \times 100 \quad (2)$$

$$Rendimento\ (g\ produto/100\ g\ castanha) = \frac{massa\ da\ coalhada\ x\ 100\ g}{massa\ de\ castanha} \quad (3)$$

4.6.3 Teor de umidade

A umidade corresponde à água presente no alimento. Quando um produto é exposto a circunstâncias que promovem a remoção da água, a diferença de massa entre o resíduo úmido

e seco constitui o teor de umidade presente na amostra. Para a determinação da umidade, seguiu-se a metodologia descrita em Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005). As amostras foram pesadas em cápsula de porcelana e levadas em estufa a 105 °C até o peso constante. O teor de umidade foi determinado através da Equação 4.

$$Umidade\ (\%) = \frac{massa\ de\ água\ perdida}{massa\ da\ amostra} \times 100 \quad (4)$$

4.6.4 Dosagem de proteínas

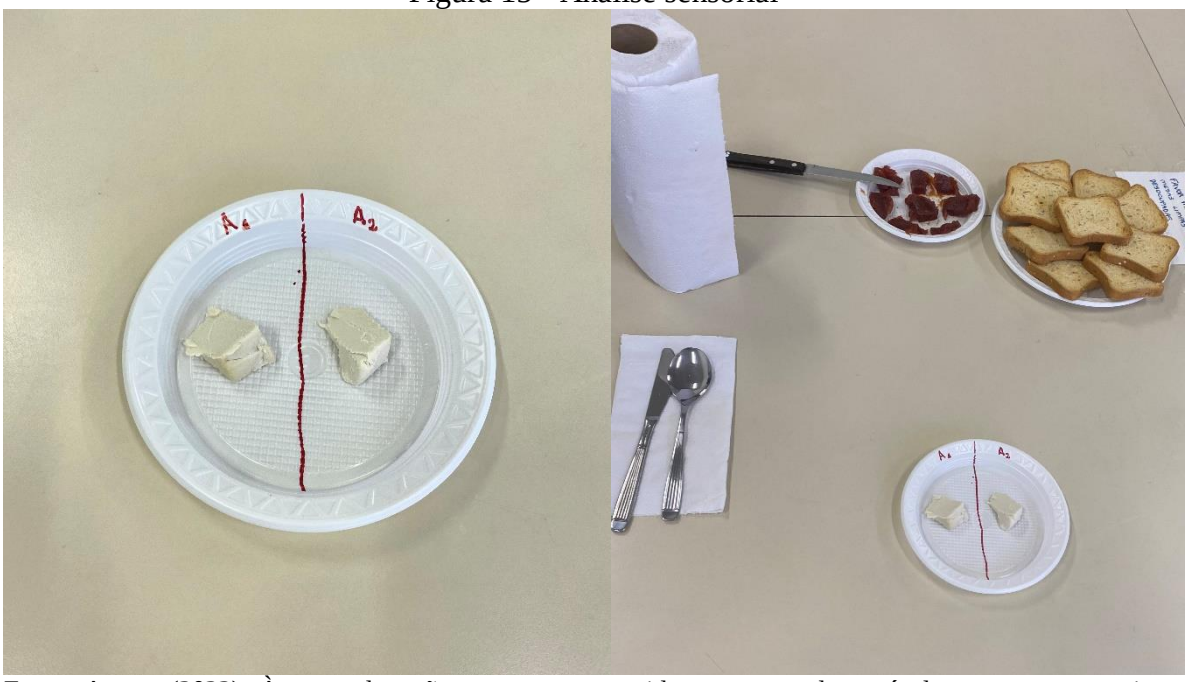
Através do método de Peterson modificado por Lowry (1951) determinou-se a quantidade de proteínas presente no extrato de castanha-de-caju, soro e queijo vegetal. A curva-padrão foi construída por meio da adição de albumina e água em microplaca, para a obtenção das concentrações de 0, 2, 5, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 mg/mL. Em seguida, 2 μL de amostra foram adicionadas na microplaca e diluídas com 98 μL de água deionizada. O volume de 100 μL do reagente de Lowry foi adicionado em todos os tubos que permaneceram em repouso por 10 minutos. Adicionou-se 50 μL do reagente de Folin. A mistura foi homogeneizada e incubada por 30 minutos. Os microtubos foram lidos em espectrofotômetro a 620 nm e as absorbâncias encontradas para a curva e amostras foram subtraídas do branco. A concentração de proteínas, expressa em g/L, foi calculada com a equação da reta determinada através dos valores da curva-padrão.

4.6.5 Análise sensorial

As amostras de queijo vegetal não fermentado (controle) e fermentado (probiótico), foram submetidas a análise sensorial com 14 participantes não treinados, sendo 2 veganos, 2 vegetarianos e 10 onívoros. Com o intuito de compreender a aceitação de um produto vegetal e fermentado, o teste foi realizado através de escala hedônica de 5 pontos aos atributos: sabor, cor, textura, aroma, acidez, salgado, aceitação global e intenção de compra. Conforme questionário presente no Apêndice A.

As amostras foram apresentadas à temperatura ambiente em cortes de aproximadamente 4 g e dispostas em prato descartável branco com identificação das amostras (A_1 para a amostra controle e A_2 para o queijo probiótico). Juntamente aos produtos foram servidos torradinhas e doce de goiaba como acompanhamento, conforme representado na Figura 15.

Figura 15 - Análise sensorial



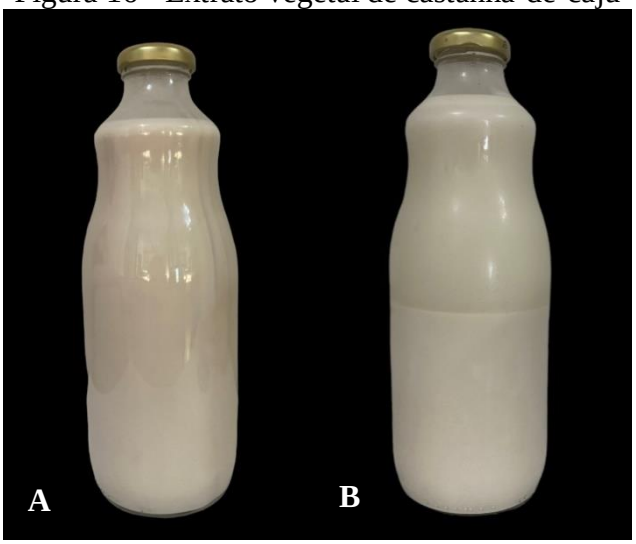
Fonte: Autora (2022). À esquerda estão as amostras servidas em prato descartável com suas respectivas nomeações. À direita está a apresentação das amostras com os complementos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERÍSTICAS DO EXTRATO VEGETAL

O extrato vegetal produzido apresentou homogeneidade e coloração branca leitosa. Houve a formação de um sedimento branco no fundo da garrafa quando armazenado sob refrigeração a 10 ºC conforme pode ser observado na Figura 16.

Figura 16 - Extrato vegetal de castanha-de-caju



Fonte: Autora (2022). Extrato vegetal de castanha-de-caju A) homogêneo B) sedimentado.

5.2 AVALIAÇÃO DA COAGULAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL

Os testes para avaliação da coagulação por diferentes tratamentos resultaram na formação de três variedades de coalhada, apresentadas na Figura 17, nomeados de coágulo 1, 2 e 3, cujas características serão discutidas adiante.

Figura 17 - Tipos de coágulos obtidos com os tratamentos de coagulação

Coágulo Tipo 1	Coágulo Tipo 2	Coágulo Tipo 3

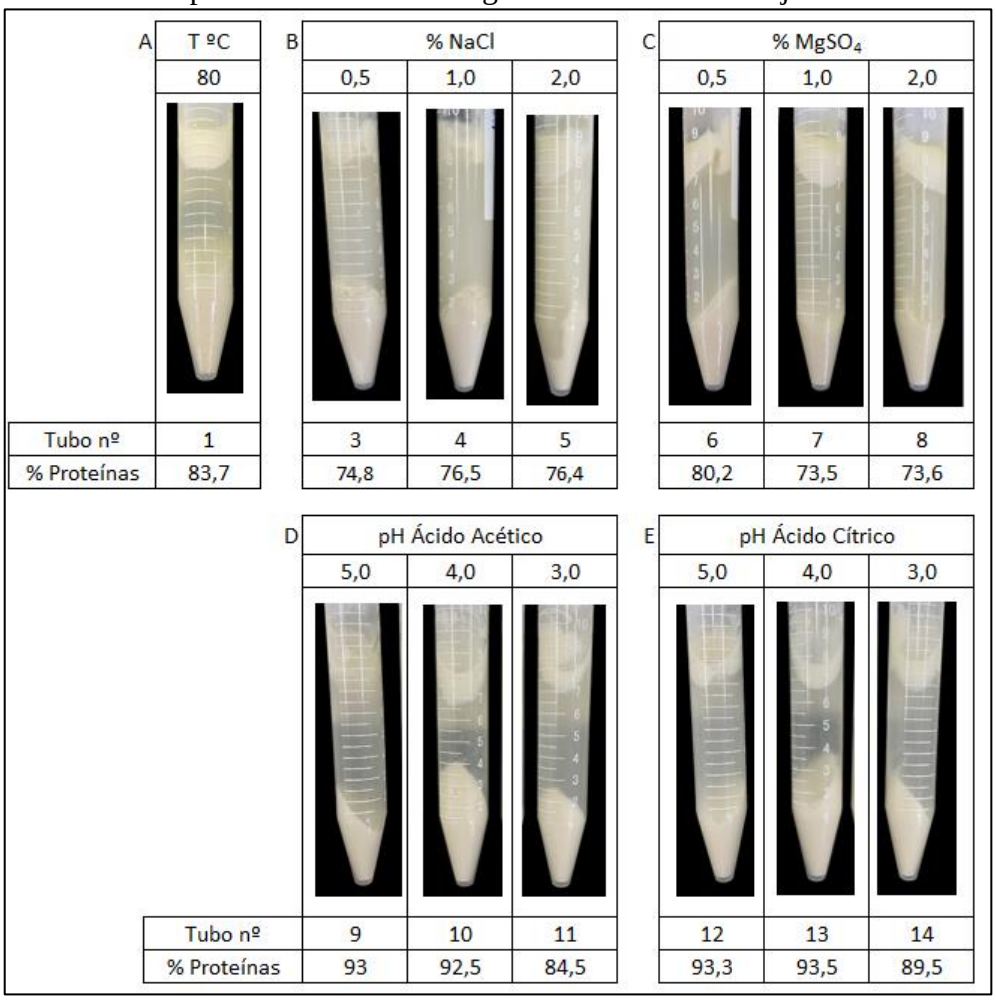
Fonte: Autora (2022)

5.2.1 Tratamentos que formaram o coágulo tipo 1

O coágulo tipo 1 (Figura 6) foi identificado como frágil, liquefeito, arenoso e com grãos muito pequenos. Além disso, após a centrifugação para obtenção do soro, três fases foram formadas: uma fase sólida e duas líquidas, sendo a intermediária aquosa e variando de opaca a translúcida, e a superior, de menor densidade, com aspecto gorduroso.

Com exceção do calor de 127 ºC, todos os tratamentos individuais resultaram na separação das 3 fases e formação do coágulo tipo 1, conforme mostra a Figura 18. Os tratamentos foram temperatura de 80 ºC, adição de sais (NaCl e $MgSO_4$) nas três concentrações avaliadas (0,5, 1,0 e 2,0 %) além da acidificação tanto com Ácido Acético quanto com Ácido Cítrico nos diferentes valores de pH (5,0, 4,0 e 3,0).

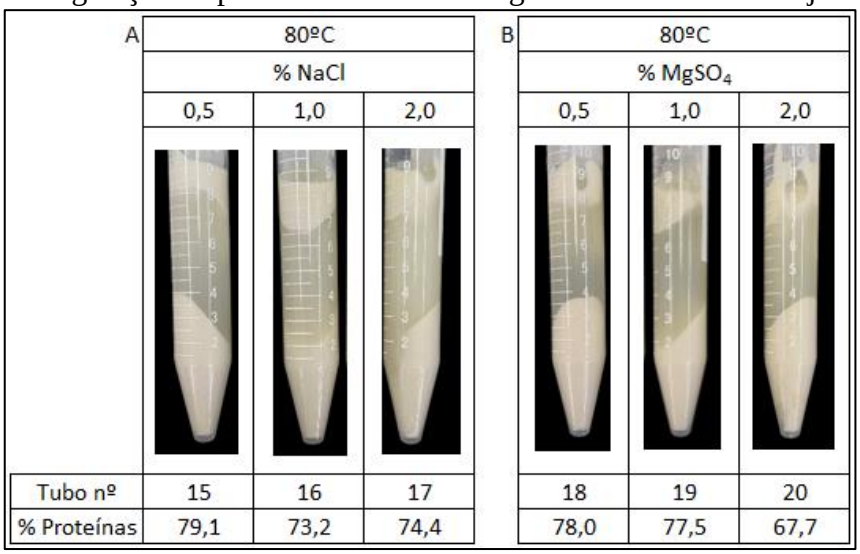
Figura 18 - Efeito de calor de 80º C e concentrações de sais e pH sobre a coagulação de proteínas do extrato vegetal de castanha-de-caju



Fonte: Autora (2022). A) temperatura de 80 ºC (tubo 1); B) adição de NaCl em todas as concentrações (tubos 3, 4 e 5); C) adição de $MgSO_4$ em todas as concentrações (tubos 6, 7 e 8); D) acidificação com Ácido Acético (tubos 9,10 e 11) e E) acidificação com Ácido Cítrico (tubos 12, 13 e 14).

A combinação de diferentes tratamentos também formou, em sua maioria coágulos do tipo 1 e a separação em três fases após a centrifugação. A Figura 19 mostra a combinação de calor a 80 ºC com diferentes concentrações de NaCl e $MgSO_4$ (Tubos 15 a 20).

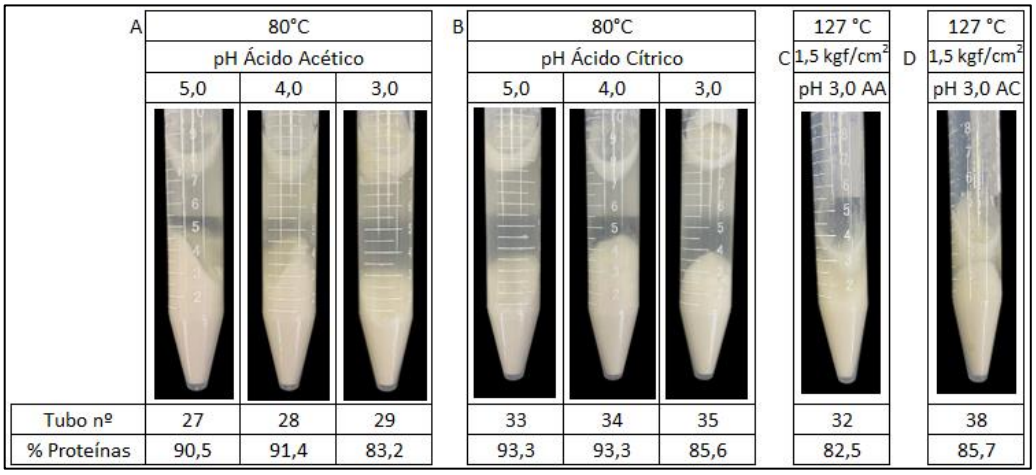
Figura 19 - Efeito da combinação de calor a 80 ºC e diferentes concentrações de sais sobre a coagulação de proteínas do extrato vegetal de castanha-de-caju



Fonte: Autora (2022). A) combinação de calor a 80 ºC e NaCl a 0,5, 1,0 e 2,0 % (tubos 15, 16, e 17); B) combinação de calor a 80 ºC e $MgSO_4$ a 0,5, 1,0 e 2,0 % (tubos 18, 19, e 20).

Os métodos de ajuste do pH do extrato para 5, 4 e 3 com ácido cítrico ou acético e temperatura de 80 °C e ajuste do pH do extrato para 3 com ácido cítrico ou acético e temperatura de 127 °C, Figura 20, resultaram no coágulo tipo 1.

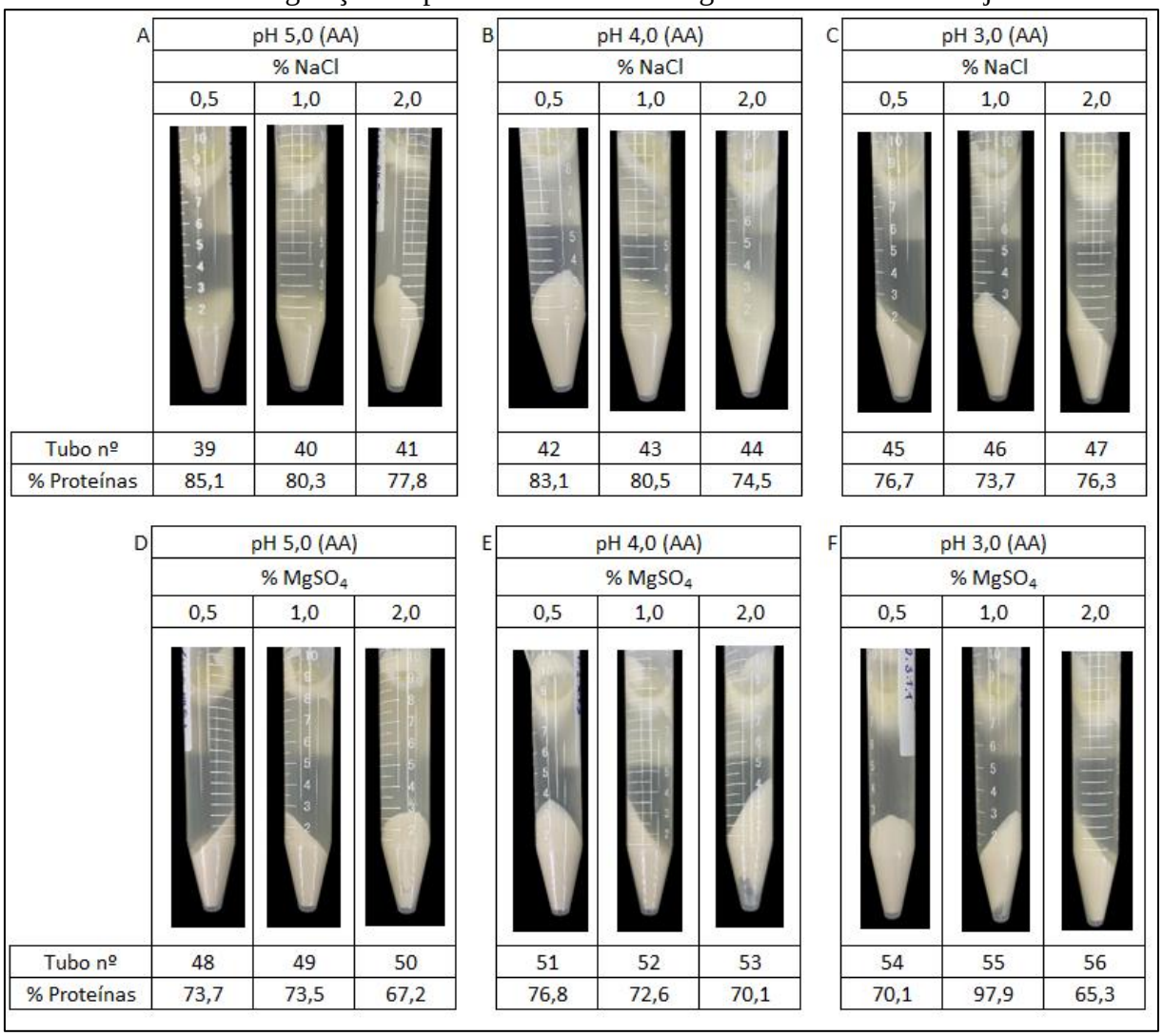
Figura 20 - Efeito da combinação do ajuste do pH e calor a 80 °C e ajuste do pH para 3 e calor 127 °C



Fonte: Autora (2022). A) acidificação com ácido acético e temperatura de 80 °C (tubos 27, 28, e 29); B) acidificação com ácido cítrico e temperatura de 80 °C (tubos 33, 34, e 35); C) ajuste do pH para 3 com ácido acético e temperatura de 127 °C (tubo 32); D) ajuste do pH para 3 com ácido cítrico e temperatura de 127 °C (tubo 38).

Da mesma forma, diferentes valores de pH acertados tanto com Ácido Acético, Figura 21, e com Ácido Cítrico, Figura 22, combinados com as diferentes concentrações de NaCl e $MgSO_4$ formaram coágulo caracterizado como do tipo 1.

Figura 21 - Efeito da combinação Ácido Acético e diferentes concentrações de NaCl e $MgSO_4$ sobre a coagulação de proteínas de extrato vegetal de castanha-de-caju

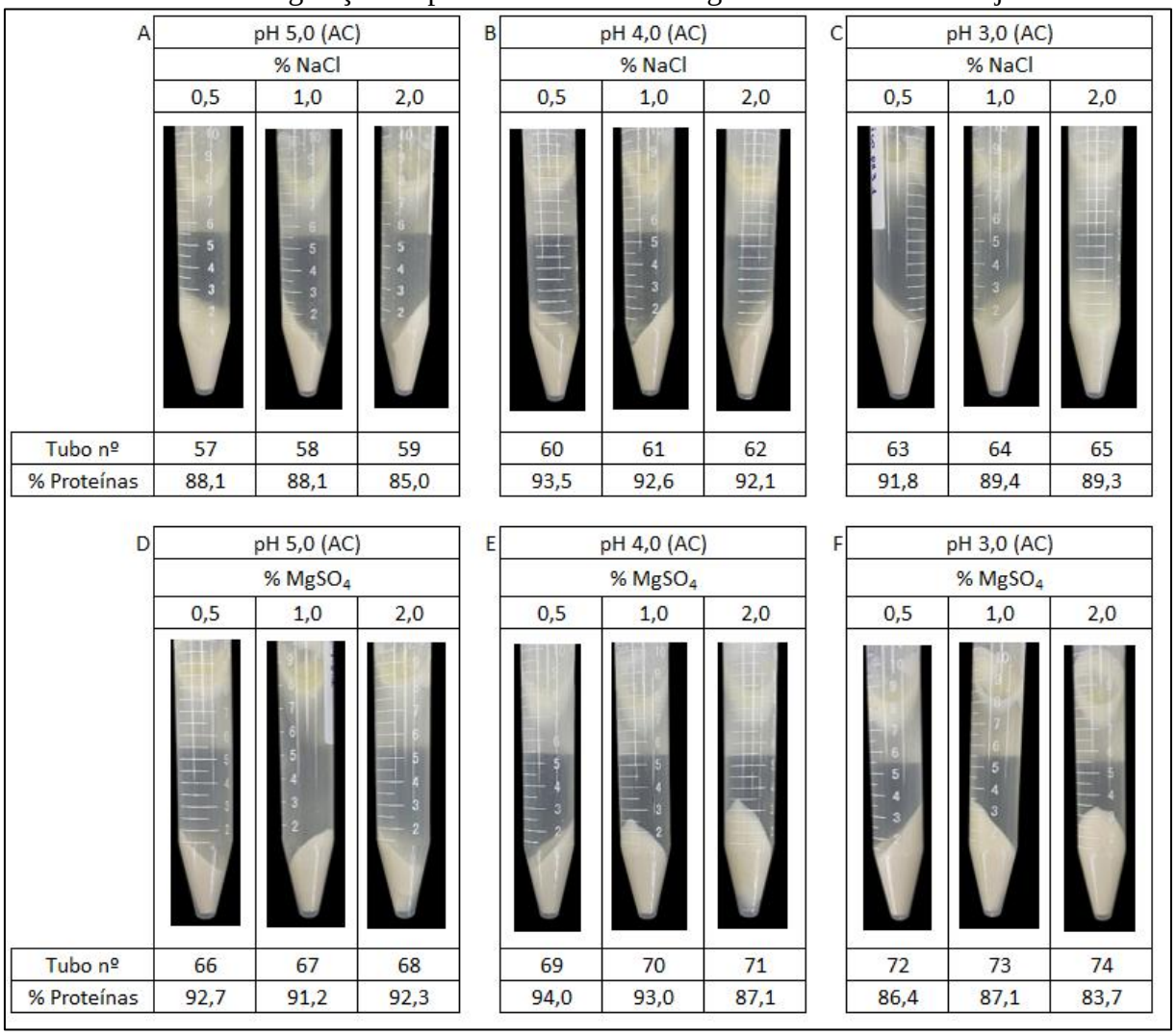


	A			B			C		
	pH 5,0 (AA)			pH 4,0 (AA)			pH 3,0 (AA)		
	% NaCl			% NaCl			% NaCl		
	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0
Tubo nº	39	40	41	42	43	44	45	46	47
% Proteínas	85,1	80,3	77,8	83,1	80,5	74,5	76,7	73,7	76,3

	D			E			F		
	pH 5,0 (AA)			pH 4,0 (AA)			pH 3,0 (AA)		
	% $MgSO_4$			% $MgSO_4$			% $MgSO_4$		
	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0
Tubo nº	48	49	50	51	52	53	54	55	56
% Proteínas	73,7	73,5	67,2	76,8	72,6	70,1	70,1	97,9	65,3

Fonte: Autora (2022). combinação de acidificação com Ácido Acético A) pH 5 e adição de NaCl em todas as concentrações (tubos 39, 40, 41); B) pH 4 e adição de NaCl em todas as concentrações (tubos 42, 43, 44); C) pH 3 e adição de NaCl em todas as concentrações (tubos 45, 46, 47); D) pH 5 e adição de $MgSO_4$ em todas as concentrações (tubos 48, 40, 50); E) pH 4 e adição de $MgSO_4$ em todas as concentrações (tubos 51, 52, 53); F) pH 3 e adição de $MgSO_4$ em todas as concentrações (tubos 54, 55, 56).

Figura 22 - Efeito da combinação Ácido Cítrico e diferentes concentrações de NaCl e $MgSO_4$ sobre a coagulação de proteínas de extrato vegetal de castanha-de-caju



A	pH 5,0 (AC)			B	pH 4,0 (AC)			C	pH 3,0 (AC)		
	% NaCl				% NaCl				% NaCl		
	0,5	1,0	2,0		0,5	1,0	2,0		0,5	1,0	2,0
Tubo nº	57	58	59		60	61	62		63	64	65
% Proteínas	88,1	88,1	85,0		93,5	92,6	92,1		91,8	89,4	89,3

D	pH 5,0 (AC)			E	pH 4,0 (AC)			F	pH 3,0 (AC)		
	% $MgSO_4$				% $MgSO_4$				% $MgSO_4$		
	0,5	1,0	2,0		0,5	1,0	2,0		0,5	1,0	2,0
Tubo nº	66	67	68		69	70	71		72	73	74
% Proteínas	92,7	91,2	92,3		94,0	93,0	87,1		86,4	87,1	83,7

Fonte: Autora (2022). combinação de acidificação com Ácido Cítrico A) pH 5 e adição de NaCl em todas as concentrações (tubos 57, 58, 59); B) pH 4 e adição de NaCl em todas as concentrações (tubos 60, 61, 62); C) pH 3 e adição de NaCl em todas as concentrações (tubos 63, 64, 65); D) pH 5 e adição de $MgSO_4$ em todas as concentrações (tubos 66, 67, 68); E) pH 4 e adição de $MgSO_4$ em todas as concentrações (tubos 69, 70, 71); F) pH 3 e adição de $MgSO_4$ em todas as concentrações (tubos 72, 73, 74).

Este acontecimento pode ser explicado, pois os tratamentos empregados não induziram a formação do coágulo, apenas a precipitação das proteínas. Visto que essa característica é incomum no processo de coagulação, que resulta na formação de uma rede proteica que aprisiona a gordura. A precipitação consiste na diminuição da solubilidade das moléculas proteicas, promovendo o aumento da interação proteína-proteína e formação de partículas agregadas insolúveis e de maior massa específica, que tendem a separar-se da solução e sedimentar. Enquanto a coagulação é a formação de uma estrutura tridimensional através da precipitação e agregação das proteínas presentes no fluido que resulta na obtenção da coalhada

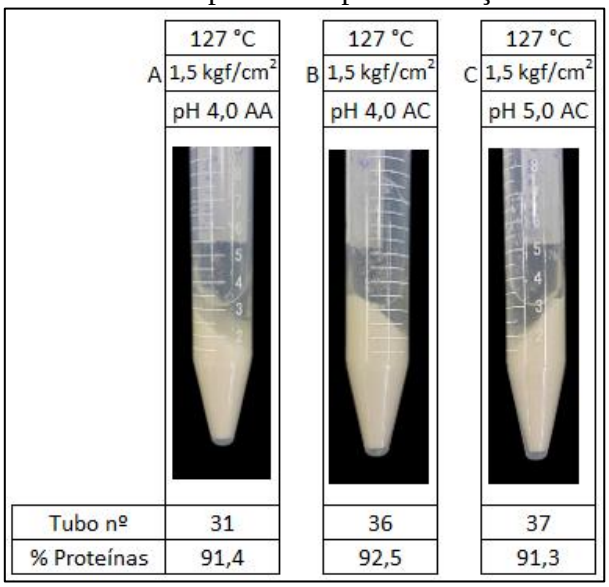
e do soro, subproduto líquido composto por água e componentes solúveis (ORDÓÑEZ, 2005; DAMODARAN; PARKIN, 2019).

Desta forma, calor de 80 ºC, acidificação e a presença de sais em diferentes concentrações assim como a combinação desses fatores, e o ajuste do pH do extrato para 3 com ácido acético ou cítrico e aquecimento a 127 °C, não foram efetivos na formação de um coágulo adequado à produção de queijo. Visto que devido à formação de grumos muito pequenos, os mesmos seriam perdidos no momento da dessora, ocasionando um menor rendimento. Além disso, a formação de três fases após a centrifugação demonstrou a fragilidade desta coalhada e, de certa forma, levantando dúvidas quanto à formação de um coágulo propriamente dito, que engloba proteínas e glóbulos de gordura (DAMODARAN; PARKIN, 2019) Sendo assim, os tratamentos que resultaram na formação do coágulo tipo 1 não são adequados à produção de queijos vegetais.

5.2.2 Tratamentos que resultaram na formação do coágulo tipo 2

Os métodos de ajuste do pH do extrato para 5 ou 4 com ácido cítrico e temperatura de 127 °C e ajuste do pH do extrato para 4 com ácido acético e temperatura de 127 °C, originaram o coágulo 2, apresentados na Figura 23.

Figura 23 - Tratamentos responsáveis pela formação do coágulo tipo 2



Fonte: Autora (2022). (A) ajuste do pH do extrato para 4 com ácido acético e temperatura de 127 °C (tubo 31); (B) ajuste do pH do extrato para 4 com ácido cítrico e temperatura de 127 °C (tubo 36); (C) ajuste do pH do extrato para 5 com ácido cítrico e temperatura de 127 °C (tubo 37);

Esta coalhada apresentou características intermediárias, visto que era composta por grãos de tamanho médio e com consistência gelatinosa e firme, mas em menores proporções que o coágulo tipo 3 (discutido adiante). Após a centrifugação, foi possível observar a formação de apenas duas fases, o coágulo e sobrenadante, obtendo-se um soro de maior limpidez quando comparado ao coágulo tipo 1.

Quando comparado ao coágulo tipo 1, o aumento no tamanho dos grumos e a formação de apenas duas fases após a centrifugação do coágulo tipo 2, indicam a produção de um coágulo mais adequado à confecção de queijos vegetais. Além disso, a massa formada é facilmente homogeneizada e de rápida dessora, fato que favorece a inoculação de microrganismos probióticos.

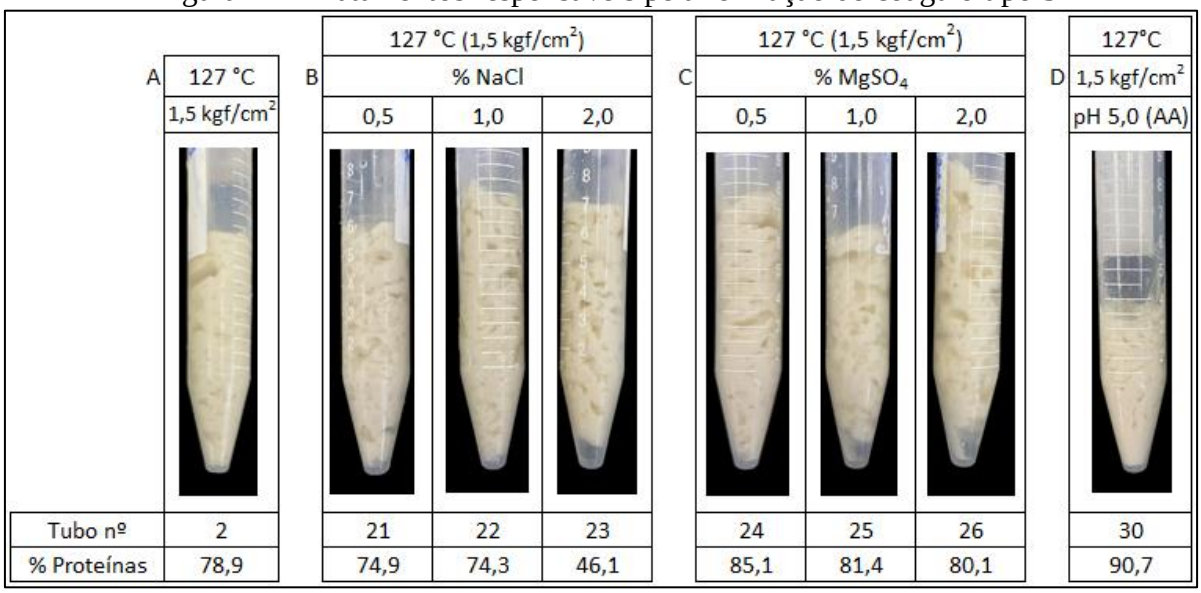
Recomenda-se a elaboração de coalhadas com grãos pequenos na produção de queijos. As partículas de tamanho menor propiciam a saída do soro em função da maior área superficial, porém, é desfavorável a formação de grumos muito pequenos, por serem removidos juntamente ao soro no processo de dessoragem (FRACASSO; PFÜLLER, 2014). Além disso, como o objetivo do trabalho é a produção de um alimento tipo queijo probiótico, é preferível a obtenção de coalhadas com menor permeabilidade. Visto que no processo de inoculação, coágulos permeáveis permitem a passagem da suspensão bacteriana resultando em perdas do inóculo. Dessa forma, os tratamentos que resultaram no coágulo tipo 2, são preferíveis em comparação aos métodos apresentados.

A faixa de pH entre 3 e 5 é a de menor solubilidade das proteínas presentes na castanha-de-caju, conforme Liu e colaboradores (2018). Contudo o ajuste para pH 4 e 5 apresentaram melhor resposta de coagulação em comparação ao pH 3, que resultou na formação do coágulo tipo 1.

5.2.3 Tratamentos que resultaram na formação do coágulo tipo 3

Para os tratamentos, temperatura de 127 °C à pressão de 1,5 kgf/cm^2; adição de NaCl ou $MgSO_4$ em concentração de 0,5, 1 ou 2 % (m/v) e temperatura de 127°C (1,5 kgf/cm^2); ajuste do pH do extrato para 5 com ácido acético e temperatura de 127 °C (1,5 kgf/cm^2), obteve-se o coágulo tipo 3, classificado como firme, resistente, gelatinoso, permeável e com grumos grandes. Houve a formação e separação do coágulo e soro. Contudo o soro encontrava-se entre os grãos da coalhada, conforme observado na Figura 24.

Figura 24 - Tratamentos responsáveis pela formação do coágulo tipo 3



Fonte: Autora (2022). Coágulo tipo 3 formado a partir do tratamento: (A) temperatura de 127°C (tubo 2); (B) adição de NaCl em 0,5%, 1% e 2 % (m/v) e temperatura de 127°C (tubos 21, 22, 23); (C) adição de $MgSO_4$ em 0,5%, 1% e 2 % (m/v) e temperatura de 127 °C (tubos 24, 25, 26); (D) ajuste do pH do extrato para 5 com ácido acético e temperatura de 127 °C (tubo 30).

Assim, os tratamentos que envolveram o aquecimento em 127 ºC à pressão de 1,5 kgf/cm^2, associados ou não à adição de sais nas três concentrações testadas e pH 5 ajustado com Ácido Acético, apresentaram a formação de um coágulo mais firme e compatível com a produção de um queijo vegetal, tendo em vista a redução da perda de material proteico através da dessora. No entanto, no que diz respeito a inoculação de microrganismos probióticos, a firmeza dos grãos deste coágulo poderia dificultar a distribuição homogênea dos microrganismos ao longo de toda a massa coagulada. Desta forma, os tratamentos que levam à formação do coágulo tipo 3 seriam mais indicados à produção de queijos não inoculados.

Os tratamentos realizados com alta temperatura (127 °C), proporcionaram a coagulação e formação de coalhadas mais resistentes. Segundo Damodaran e Parkin (2019), a maioria dos géis proteicos são formados através do aumento da temperatura do fluido. No processo de gelificação, o aquecimento proporciona a desnaturação das proteínas e induz a transição do estado líquido para pró-gel. Esse estado facilita o acontecimento da próxima etapa, pois uma porção significativa de grupos funcionais encontram-se expostos, ocasionando a agregação das proteínas e constituição da rede proteica.

Quando uma solução com concentração proteica superior ao valor crítico é submetida a aquecimento acima da sua temperatura de desnaturação, ocorre a formação do coágulo (DAMODARAN; PARKIN, 2019). Isso explica porque o tratamento com temperatura de

127°C promoveu a formação de uma coalhada com características desejadas, enquanto o tratamento de aquecimento de 80 °C resultou apenas na precipitação das proteínas. Além disso, outro fator que pode ter favorecido a formação do coágulo tipo 3 é a combinação dos agentes temperatura e pressão. Como o extrato vegetal foi aquecido à 127 °C em autoclave, que para atingir essa temperatura chega a uma pressão de 1,5 kgf/cm^2 (1,452 atm), o aumento da pressão pode ter auxiliado no desdobramento das moléculas proteicas, expondo os grupos funcionais e facilitando a interação proteína-proteína. Contudo, tem-se a necessidade de avaliar a atuação do calor de 127 °C e aumento da pressão de forma individual, a fim de compreender se houve efeito sinérgico ou apenas um dos agentes proporcionou o efeito de coagulação.

5.2.4 Considerações a respeito da escolha do método de coagulação

A proteína é um componente fundamental na fabricação de queijos, pois além de serem responsáveis por fornecer a aparência e textura devido a coagulação, estas desempenham funções importantes no desenvolvimento do sabor e aroma do queijo (THOMAS; PRITCHARD, 1987). Com isso, a escolha entre os métodos de coagulação que formaram o coágulo 2, deu-se através do tratamento que apresentou maior porcentagem de proteínas coaguladas. Os resultados da dosagem de proteínas obtidos por meio do método de Peterson modificado por Lowry (1951) para cada tratamento, Tabela 4, não apresentaram diferenças significativas. Contudo o método de coagulação realizado através do ajuste do pH do extrato para 5 com ácido cítrico e temperatura de 127 °C à pressão de 1,5 kgf/cm^2, resultou em maior valor numérico (92,48 %), sendo o tratamento indicado para coagulação do extrato vegetal de castanha-de-caju.

Tabela 4 - Porcentagem de proteína coagulada a partir dos métodos de coagulação

Tratamento	Proteína coagulada (%)
Ajuste do pH do extrato para 5 com ácido cítrico e temperatura de 127 °C à pressão de 1,5 kgf/cm^2	92,48 ± 0,89
Ajuste do pH do extrato para 4 com ácido cítrico e temperatura de 127 °C à pressão de 1,5 kgf/cm^2	91,35 ± 1,52
Ajuste do pH do extrato para 4 com ácido acético e temperatura de 127 °C à pressão de 1,5 kgf/cm^2	91,39 ± 0,68

Fonte: Autora (2022). Média ± desvio padrão.

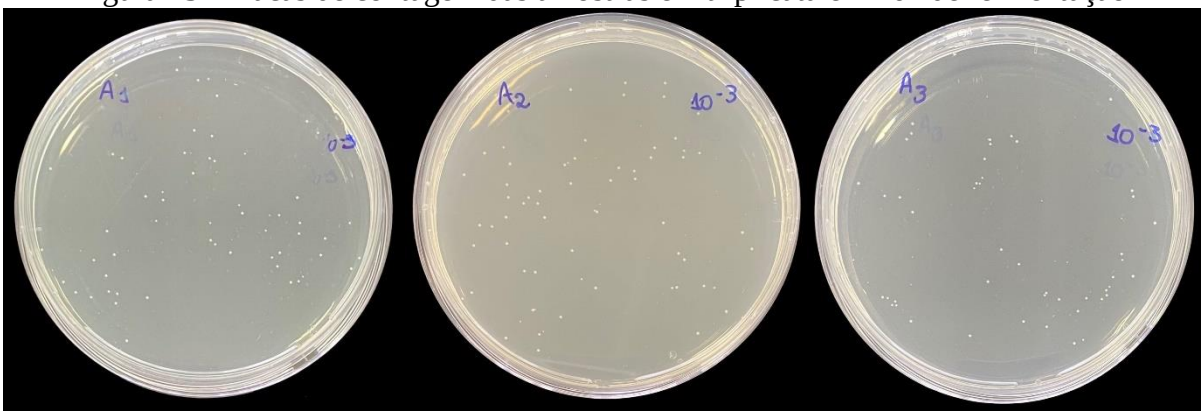
5.3 AVALIAÇÃO DO QUEIJO VEGETAL

5.3.1 Análise microbiológica

A análise microbiológica, realizada através da contagem de microrganismos viáveis, teve o intuito de verificar a quantidade de microrganismos durante diferentes períodos de fermentação e a existência de contaminantes além da bactéria *Bacillus clausii* no análogo de queijo.

O resultado médio da análise microbiológica do extrato de castanha-de-caju e queijo vegetal em 16, 24 e 72 horas de fermentação estão representados na Figura 25 e descritos na Tabela 5.

Figura 25 - Placas de contagem das amostras em triplicata em 16h de fermentação



Fonte: Autora (2022)

Tabela 5 - Resultado da contagem de microrganismos viáveis no extrato de castanha-de-caju e queijo vegetal em diferentes períodos de fermentação

Extrato de castanha-de-caju	
Microrganismos viáveis (UFC/mL)	$6,49 \times 10^7$
Queijo vegetal	
Tempo de fermentação	Microrganismos viáveis (UFC/g)
16h	$1,15 \times 10^7$
24h	$1,47 \times 10^7$
72h	$1,25 \times 10^7$

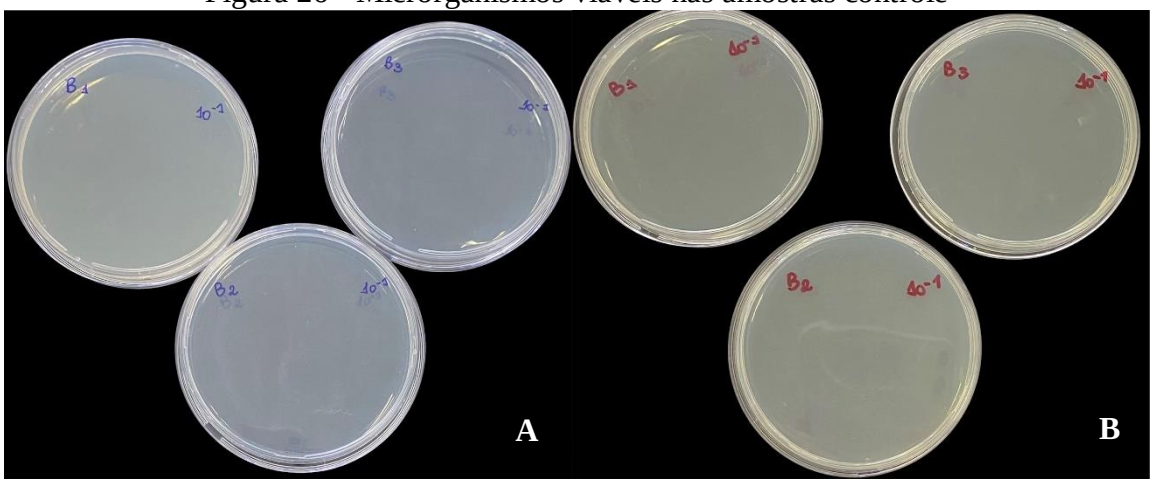
Fonte: Autora (2022)

Segundo Kurmann e Rasic (1991) os alimentos necessitam ter uma contagem mínima de 10^6 – 10^7 UFC do probiótico por grama do produto. Para os três períodos avaliados, o queijo vegetal elaborado encontra-se dentro do padrão necessário para ser classificado como probiótico. Embora uma diminuição significativa na concentração da bactéria pode ser observada após 72h. Almeida (2017) cita que em resolução da ANVISA 2008, é recomendado uma ingestão diária mínima de 10^8 – 10^9 UFC. Para o queijo probiótico desenvolvido, composto por 10^7 UFC/g, essa recomendação pode ser alcançada com o consumo de 10g do produto.

Houve efeito significativo do tempo de fermentação no crescimento da cultura. Assim, dependendo do produto desejado, como é o caso de queijos maturados, faz-se necessário a inoculação de uma maior concentração da bactéria *Bacillus clausii* no coalho, para garantir que o produto alcance o número populacional necessário do probiótico (10^6 – 10^7 UFC/g).

O extrato vegetal de castanha-de-caju apresentou uma concentração de 6,49 x 10^7 UFC/ml, enquanto para as amostras controle, sem inoculação da cultura, não identificou-se o crescimento de colônias. Resultado que confirma a assepsia no desenvolvimento do alimento e nenhuma interferência de outros microrganismos no processo de fermentação, conforme observado na Figura 26.

Figura 26 - Microrganismos viáveis nas amostras controle



Fonte: Autora (2022). Amostras controle em 16h (A) e 24h (B) de fermentação.

5.3.2 Rendimento e avaliação de custo

O rendimento é um índice importante na produção de queijos. Sendo diretamente influenciado por vários fatores, essa variável auxilia no cálculo de custos do produto. A metodologia empregada na produção do queijo vegetal resultou em um rendimento aproximado

de 63,41 %. Deste modo, para a obtenção de 1 Kg de queijo são necessários 1,58 L de extrato vegetal ou 384,62 g de castanha-de-caju. Para o rendimento expresso em g de produto/100g de grão, encontrou-se o valor de 260 g de queijo/100g de castanha-de-caju. Ciabotti (2004) obteve valor semelhante de 275,37 g tofu/100 g grão na produção de tofu. Contudo, como a massa da coalhada foi pesada após o processo de dessoragem, tem-se a necessidade de repetir essa análise. Visto que o produto foi posteriormente submetido à prensagem, havendo diminuição do teor de umidade e possivelmente diferença no rendimento encontrado.

O custo do produto, no que diz respeito a matéria-prima, foi obtido por meio do rendimento encontrado de 260 g de queijo/100 g de amêndoas. Adquiriu-se a castanha-de-caju crua em mercado local com o preço de R$ 98,00 ao Kg. Assim, o valor estimado do Kg do queijo vegetal à base de castanha-de-caju é de R$ 37,70. Valor semelhante à alguns queijos frescos encontrados, como minas frescal à R$ 36,90 (SUPERNOSSO, 2022) e R$ 38,00 (EMPORIO NACIONAL 2020), creem cheese à R$ 39,90 (BANCA DO HOLANDÊS, 2022) e queijo quark à R$ 35,54 (ANGELONI, 2022). No entanto, se a castanha-de-caju for adquirida em escala produtiva, o preço do alimento pode ser inferior ao estimado.

O valor semelhante entre o produto vegetal e os de origem animal demonstra que o análogo de queijo desenvolvido, além de atender os grupos vegano e vegetariano, tem potencial de consumo dos indivíduos que seguem uma dieta onívora. Segundo pesquisa do IBOPE de abril de 2018, 60 % dos 2.002 entrevistados declararam que comprariam alimentos vegetarianos e veganos se estivessem com o mesmo preço que os produtos que já estão acostumados a consumir. Além disso, o resíduo sólido obtido no processo de elaboração do extrato vegetal pode ser utilizado na fabricação de um alimento tipo ricota vegetal, como apresentado por Cruz, Ribeiro e Oliveira (2020), que desenvolveram o produto com a mistura de azeite, sal, suco de limão e alho em pó ao material residual do extrato de amendoim, atribuindo maior valor à matéria-prima e reduzindo os resíduos gerados no processo de produção.

5.3.3 Teor de umidade

O teor de umidade refere-se à água contida em um alimento, englobando a umidade de superfície (água livre) e a umidade absorvida (água presente no interior do produto) (IAL, 2005). A determinação da umidade é de grande importância na indústria de alimentos, porque está diretamente relacionada à identificação e controle de qualidade. Além disso, o

conhecimento deste índice auxilia na definição das variáveis de produção do produto, como a estocagem e embalagem do alimento.

A Tabela 6 apresenta o teor de umidade do análogo de queijo controle e probiótico. Não houve diferença significativa entre os valores encontrados para cada amostra, indicando que a utilização da cultura de *Bacillus clausii* para a produção de um alimento tipo queijo probiótico, não interfere na umidade final do produto.

Tabela 6 - Teor de umidade do análogo de queijo controle e probiótico

Análogo de queijo	**Umidade**
Controle	60,55 ± 1,24
Probiótico	59,99 ± 0,40

Fonte: Autora (2022). Média ± desvio padrão.

Sharma, P., Sharma, D., e Amin (2018) produziram um queijo vegetal à base de amendoim fermentado por *Lactobacillus rhamnosus*, e não observaram diferenças significativas no teor de umidade antes e depois da fermentação, encontrando valores de 65,74 e 65,73 %, respectivamente. Chumchuere, MacDougall e Robinson (2000) obtiveram umidade de 61,5 % em um queijo de soja coagulado por ação das bactérias *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus fermentum*. Fritzen-Freire e colaboradores (2010) encontraram umidade de 60,4% no desenvolvimento de queijo minas frescal com adição e cultura probiótica de *Bifidobacterium* Bb-12 após 28 dias de armazenamento.

Na fabricação de queijos, as variedades desse alimento podem ser classificadas de acordo com a umidade e características de cura. Assim, segundo classificação apresentada por Walter e Hargrove (1972), o alimento tipo queijo à base de castanha-de-caju pode ser classificado como um queijo mole não-maturado.

5.3.4 Dosagem de proteínas

Os resultados evidenciados na Tabela 7 consistem no percentual de proteínas coaguladas, concentração de proteína do extrato vegetal e do alimento tipo queijo. A concentração de proteínas em 100 g de queijo foi determinada a partir da fração proteica do extrato vegetal, percentual coagulado e rendimento.

Tabela 7 - Resultado das análises de dosagem de proteínas do extrato e queijo vegetal

Análise	Resultado
Concentração proteica do extrato vegetal	74,38 g/L
Percentual de proteína coagulada	89,94 %
Concentração proteica em 100g de queijo	10,55 g

Fonte: Autora (2022)

O resultado encontrado na dosagem de proteínas do extrato vegetal de castanha-de-caju indicou um teor proteico de 7,44 %. Valor superior em comparação aos disponíveis na literatura. Cardoso (2016) obteve um extrato vegetal com 4,03 % de proteína através da trituração de amêndoas de caju com água na proporção de 1:2 (p/v). Dantas (2020), desenvolveu extrato de castanha-de-caju com 3,26 % de proteína utilizando a proporção de 1:6 (castanha:água). Isso se deve a diferença de metodologia empregada para a dosagem de proteína. Visto que os dois estudos citados realizam a determinação da matéria nitrogenada total através do método Kjeldahl. Enquanto neste trabalho quantificou-se as proteínas solúveis através do método de Peterson modificado por Lowry. Além disso, a composição centesimal do extrato depende das condições do processo de produção, como a proporção de castanha-de-caju e água, tempo de maceração e filtração.

Para o alimento tipo queijo, encontrou-se valores similares aos da literatura, sendo de 10,55 g de proteína para 100 g de alimento, o que corresponde a um teor proteico de 10,55 %. Pauletto e Fogaça (2012) desenvolveram tofu com concentração proteica de 11,4 g/100 g de produto. Andrade e Seibel (2016) produziram queijo *petit-suisse* com extrato de soja sabor maracujá e morango, obtendo 11,58 e 9,48 g de proteína, respectivamente, em 100 g. Na elaboração de queijo artesanal com leite de vaca e *Lactobacillus* sp., Bonfim e Rocha (2017) analisaram o teor proteico do produto antes da maturação e obtiveram um valor de 13,67 %. Chen e colaboradores (2020) obtiveram um alimento tipo queijo com 8,2 % de proteína bruta, através da trituração de castanha-de-caju com Rejulevac (fermentado à base de grãos) para obtenção de uma massa concentrada.

5.3.5 Análise sensorial

Os resultados da análise sensorial em relação às características avaliadas e a intenção de compra do queijo controle e probiótico estão representados na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores médios e desvio padrão dos atributos e intenção de compra avaliados na análise sensorial do análogo de queijo controle e probiótico

	Análogo de queijo	
Característica	**Controle**	**Probiótico**
Sabor	4,64 ± 0,61	4,43 ± 0,49
Cor	4,50 ± 0,50	4,57 ± 0,49
Textura	4,29 ± 0,80	4,00 ± 1,13
Aroma	3,79 ± 0,94	3,86 ± 0,99
Aceitação global	4,57 ± 0,49	4,50 ± 0,50
Salgado	2,79 ± 0,67	3,14 ± 0,64
Acidez	2,89 ± 0,64	3,43 ± 0,62
Intenção de compra	4,57 ± 0,62	4,00 ± 0,93

Fonte: Autor (2022). Média ± desvio padrão.

Os valores médios para os atributos sabor, cor e textura não apresentaram diferenças significativas entre as amostras. Em relação ao aroma, 57,1 % dos participantes declararam que "não gostaram nem desgostaram" para as duas amostras. Isso pode ser explicado, devido ao fato de que os produtos não passaram pelo processo de maturação. Segundo Molimard e Spinnler (1996), o aroma dos queijos é uma característica proveniente das substâncias geradas no catabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios, e essas reações bioquímicas são intensificadas durante o processo de maturação. Além disso, cada microrganismo produz distintos compostos que irão fornecer ao queijo características específicas. Assim, observa-se que o análogo de queijo à base de castanha-de-caju, submetido a curto período de fermentação por *Bacillus clausii*, promove a formação de um alimento de aroma neutro.

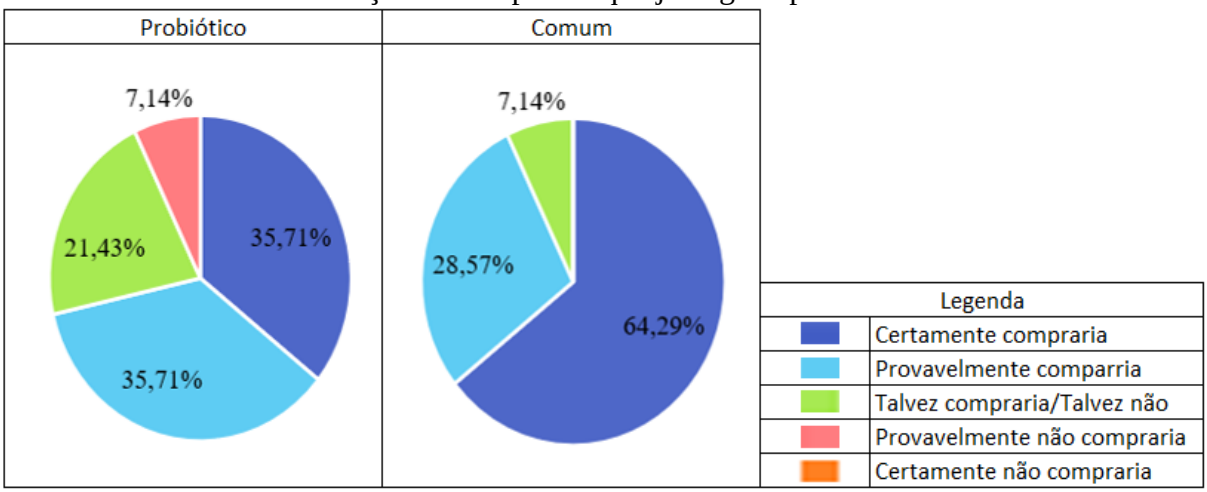
Em relação a textura, as duas amostras obtiveram valor médio próximo a resposta "gostei moderadamente". Resultado obtido em consequência da elaboração de dois queijos moles não maturados, que apresentavam maior percentual de umidade e textura pastosa, com consistência de corte, mas não a ideal para serem consumidos in natura.

O queijo vegetal fermentado foi relatado por 50 % dos provadores como "moderadamente maior que o ideal" em relação ao atributo acidez, ocasionando diferença significativa entre os valores médios das amostras avaliadas. A acidez é uma propriedade marcante dos produtos fermentados. De acordo com Hecht (1999), o *Bacillus clausii* é uma bactéria produtora de uma classe de enzimas denominada de subtilisinas, classificadas como serina-proteases com especificidade para os resíduos tirosina, triptofano e fenilalanina

(WHITAKER, 1994 citado por TARDIOLI, 2003). As enzimas proteases são responsáveis pela hidrólise das proteínas, resultando na formação de hidrolisados proteicos responsáveis por proporcionar determinadas características no sabor do queijo, como o gosto ácido (ORDÓÑEZ, 2005; DAMODARAN; PARKIN, 2019). Além disso, o extrato vegetal foi coagulado através do ácido cítrico, o que pode ter acentuado o gosto ácido das amostras fermentadas e ocasionado a nota próxima ao critério "ideal" para o queijo não inoculado. Contudo o valor médio da aceitação global dos dois análogos de queijo não apresentou diferenças significativas. Azevedo *et al*. (2011) submeteram três leites fermentados comerciais à análise sensorial obtiveram, de forma semelhante, como resultado uma preferência dos provadores e maior intenção de compra ao produto com baixa acidez.

Houve redução na atitude de compra do queijo vegetal inoculado com a bactéria em comparação ao formulado apenas com castanha-de-caju. Dos provadores, 35,7 % afirmaram que certamente comprariam o alimento probiótico. Enquanto, o valor foi de 64,29 % para a amostra controle, conforme representado no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Intenção de compra do queijo vegetal probiótico e controle



Fonte: Autora (2022). À esquerda o gráfico de intenção de compra do análogo de queijo probiótico. À direita o gráfico de intenção de compra do análogo de queijo controle.

Os resultados obtidos com a análise sensorial, visto que 71,4 % dos participantes afirmaram seguir uma dieta onívora e com isso estão habituados com o sabor dos queijos fabricados a partir do leite de vaca, demonstram que esse tipo de alimento tem potencial de consumo, atendendo tanto os indivíduos que não consomem leite de origem animal quanto aqueles que seguem uma dieta onívora.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com o presente estudo indicam que o análogo de queijo elaborado à base de castanha-de-caju e com metodologia semelhante à utilizada na fabricação de queijos, têm potencial para atender tanto os consumidores com restrição ao leite de vaca quanto aqueles que seguem uma dieta onívora.

A avaliação da coagulação do extrato vegetal de castanha-de-caju indicou que a utilização dos tratamentos de ajuste do pH para 4 ou 5 com ácido cítrico ou para pH 4 com ácido acético e temperatura de 127 °C, resultam na melhor formação de coalhada e soro límpido. Sendo o tratamento de ajuste do pH para 5 com ácido cítrico e temperatura de 127 °C o que proporcionou a maior porcentagem de proteínas coaguladas e, com isso, o mais indicado para a coagulação do extrato.

O microrganismo *Bacillus clausii* apresentou crescimento no queijo vegetal, conferindo potencial probiótico ao produto. Contudo, a contagem de bactéria diminuiu de 1,47 x 10^7 em 24 h de fermentação para 1,25 x 10^7 UFC/g em 72 h, mostrando que o valor probiótico do alimento diminui com o tempo.

Não houve diferença entre o teor de umidade do queijo vegetal probiótico do controle, mostrando que a fermentação pela cultura de *Bacillus clausii* não altera a umidade final do alimento. Por meio das análises realizadas, o produto produzido pode ser classificado como um queijo mole não maturado com teor proteico de 10,55 %.

A metodologia utilizada apresentou um rendimento aproximado de 63,41 %. Contudo, constata-se a necessidade da repetição dessa análise. Visto que a massa da coalhada foi obtida após o processo de dessoragem e o produto foi posteriormente submetido à prensagem, o que resulta em diminuição no teor de umidade e diferenças no rendimento encontrado.

A análise sensorial demonstrou uma boa aceitação do análogo de queijo probiótico e controle à base de castanha-de-caju, com percentual relevante de intenção de compra.

6.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar a caracterização completa do extrato vegetal e análogo de queijo de castanha-de-caju;
- Repetir a análise de rendimento;

- Avaliar a coagulação do extrato vegetal por diferentes tratamentos utilizando análises físico-químicas, como textura e viscosidade;
- Avaliar a adição de diferentes concentrações de inóculo e condições de fermentação para garantir um produto probiótico por maior tempo;
- Submeter o produto desenvolvido à maturação, avaliando sua composição centesimal e aceitação sensorial;
- Desenvolver o queijo vegetal por diferentes microrganismos e métodos de fabricação para a obtenção de outros tipos de queijo.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. M. de**. Viabilidade de bactérias láticas probióticas em leites fermentados comerciais**. Monografia (graduação) – Universidade Federal da Paraíba – Curso de Engenharia de Alimentos, João Pessoa, 2017.

AL-SAEDI, N. H. S. **Study on protein profiles of soybean and lupin milk and their vegan cheese production**. Murdoch University, Australia, 2020.

ANDRADE, A. P. C.; SEIBEL, N. F. Desenvolvimento de queijo petit-suisse com extrato de soja. *In*: OLIVEIRA, A. F. de.; STORTO, L. J. **Tópicos em ciência e tecnologia de alimentos:** resultados de pesquisas acadêmicas. São Paulo: Blucher, 2016. Volume 2, p. 79-101.

ANGELONI. **Queijo quark Lac Lélo Light**. Disponível em: https://www.angeloni.com.br/super/p/queijo-quark-lac-lelo-light-280g-3542404. Acesso em: 01 dez. 2022.

BANCA DO HOLANDÊS. **Queijo cream cheese Danubio um 1kg**. Disponível em: https://www.bancadoholandes.com.br/queijo-cream-cheese-danubio. Acesso em: 01 dez. 2022

BARBOZA, L. P. *et al*. Caracterização físico-química, antioxidante e de aminoácidos da castanha do baru, castanha de caju e castanha-do-brasil. *In*: SILVA, F. F. **Qualidade de produtos de origem animal 2**. Ponta Grossa: Atena, 2019, p. 6-16.

BAYER, A. de P. **Composição centesimal de extratos vegetais elaborados a partir de diferentes matérias-primas.** 2019. Monografia (graduação) – Universidade Federal de Ouro Preto – Curso de Nutrição, Ouro Preto, 2019.

BENASSI, V. T.; PRUDENCIO, S. H. **Impactos do processamento de soja na retenção de minerais, isoflavonas e proteínas em tofus.** Alimentos e Nutrição – Braziliam Journal of Food and Nutrition, Araraquara, v.24, n.1, p.51-59, 2013.

BERNAT, N. *et al*. Vegetable milks and their fermented derivative products. **International Journal of Food Studies**, v. 3, p. 93-124, 2014.

BONFIM, J. M.; ROCHA, R. **Caracterização físico-química de queijo maturado por culturas autóctones**. Monografia (graduação) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Curso de Tecnologia em Alimentos, Londrina, 2017.

BRANCO, M. S. C. *et al*. Classificação da intolerância à lactose: uma visão geral sobre causas e tratamentos. **Revista Ciência Médica**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 117-125, 2017.

BRASIL (MAPA). **Portaria n° 146 e 07 de março de 1996**. Disponível em: http://www.agais.com/normas/leite/queijos.htm. Acesso em: 03 abr. 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005.** Aprova o "Regulamento técnico para produtos proteicos de origem vegetal". Brasília, DF: ANVISA, 2005. Disponível em: http://www.brasnutri.org.br/arquivos/legislação/RDC_268.pdf. Acesso em: 27 jun. 2018.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da União,** Brasília, Seção 1, p.13, 2002.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. **Microbiota Lática de Queijos Artesanais**. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, 2009.

CAMPOS, T. **Tudo sobre como plantar caju orgânico**. 2018. Disponível em: https://thiagoorganico.com/como-plantar-caju-organico/. Acesso em: 04 jul. 2022.

CARDOSO, C. de. O. **Processamento, produção e conservação do extrato fluido (leite) de castanha de caju (*Anacardium occidentale L.*)**. Monografia (graduação) – Universidade Federal do Maranhão – Curso de Química Industrial, São Luís, 2016.

CAVALHEIRO, C. A. *et al*. Difusão do vegetarianismo e veganismo no Brasil a partir de uma perspectiva de transnacionalização. **Revista Eletrônica Ciências da Administração e Turismo**, Santa Catarina, v. 6, n. 1, p.51-67, 2018.

CHAGAS, L. de. M**. Influência *de Streptococcus thermophilus* produtor de exopolissacarídeos em iogurte natural com baixo teor de lactose**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2012.

CHEESE IN THE CITY. **How does milk transform into cheese?.** 2019. Disponível em: https://www.cheese-in-the-city.com/2019/05/01/milk-coagulation.html. Acesso em: 23 nov. 2022.

CHEN, J. M. *et al*. Nutritional, microbial, and allergenic changes during fermentation of cashew 'cheese' product using a quinoa-based rejuvelac starter culture. **Nutrients**, v. 12, n. 3, 2020.

CHUMCHUERE, S.; MACDOUGALL, D. B.; ROBINSON, R. K. Production and properties of a semi-hard cheese made from soya milk. **International Journal of Food and Technology**, v. 35, p. 577-581, 2000.

CIABOTTI, S. **Aspectos químico, físico e sensorial de extrato de soja e tofus obtidos dos cultivares de soja convencional e livre e lipoxigenase**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

COUCEIRO, P. *et al*. Padrão alimentar da dieta vegetariana. **Einstein**, São Paulo, v. 6, n. 3, p. 365-73, 2008.

CRUZ, G. N. da S.; RIBEIRO, M. C. B.; OLIVEIRA, V. R. Alimentos tipo queijo à base de extrato vegetal de amendoim: desenvolvimento de requeijão e ricota. **Revista Ciência em Evidência**, Capivari, v. 1, n. 2, p. 76-86, 2020.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles – Review and possible improvements. **Soft Matter**, v. 7, p. 2265–2272, 2011.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química dos alimentos de Fennema**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

DANTAS, M. M. **Extrato líquido vegetal de amêndoa de caju (*Anacardium ocidentale* L.): produção, caracterização e aplicação no desenvolvimento de sorvete.** 2020. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020.

DONEDA, D. **Vegetarianismo na gestação, lactação, infância e adolescência.** 1 ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2021.

EMPORIO NACIONAL. **Queijo fresco Camanducaia frescal**. Disponível em: http://empnacional.com.br/loja/produto/queijos/queijos-tradicionais/queijos-fresco-camanducaia-frescal-300-a-500grs/87/. Acesso em: 01 dez. 2022.

FERRIGNO, M. V. **Veganismo e libertação animal: um estudo etnográfico.** 2012. Dissertação (Mestrado em Antropologia Social) – Instituto de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

FIESP; IBOPE. **Pesquisa Nacional Fiesp/IBOPE sobre o perfil do consumo de alimentos no Brasil**. 2010. Disponível em: https://ciorganicos.com.br/wp-content/uploads/2016/10/EST_PESQFoodTrendsl.pdf. Acesso em: 25 abr. 2022.

FRACASSO, R.; PFÜLLER, E. E. Processamento do leite para a fabricação do queijo na indústria de laticínios Camozzato Ltda, Sananduva - RS. **Revista de Agronomia e Medicina Veterinária**, v. 1, n. 2, 2014.

FRITZEN-FREIRE, C. B. *et al*. The influence of Bifidobacterium Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. **Journal of Food Engineering,** v. 96, n. 4, p. 621-627, 2010.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applies Bacteriology**, Oxford, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

GROSSMANN, L.; MCCLEMENTS, D. J. The Science of plant-based foods: approaches toc reate nutritious and sustainable plant-based cheese analogs. **Trends in Food Science & Technology**, v. 118, p. 207-229, 2021.

HECHT, G. Innate mechanism of epithelial host defense. Spotligth on intestine. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 277, n. 3, p. 351 –358, 1999.

IAL. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** 4ª ed., Editora Adolfo Lutz, São Paulo, 2005.

IBOPE. **Pesquisa de Opinião Pública Sobre Vegetarianismo**. Abril de 2018. Disponível em: https://www.svb.org.br/images/Documentos/JOB_0416_VEGETARIANISMO.pdf. Acesso em: 29 mar. 2022.

INSTITUTO CAJU BRASIL. **Boletim ICB: o agronegócio caju em números**. N° 02, dez. 2019. Disponível em: https://cajubrasil.org/wp-content/uploads/2019/12/Boletim-ICB_2.pdf. Acesso em: 04 jul. 2022.

KURMANN, J. A.; RASIC, J. L. The health potential of products containing *Bifidobacteria*. *In*: ROBINSON, R. K. **Therapeutic of fermented milks**. London: Elsevier, 1991, p. 117-158.

LAMPERT, S.; AGNOL, V, D. **Caracterização de queijo colonial obtido a partir de leite cru e pasteurizado no município de São Miguel do Oeste – SC**. 2019. Monografia (graduação) – Instituto Federal de Santa Catarina – Curso de Tecnologia de Alimentos, São Miguel do Oeste, 2019.

LEPETUSO, L. R. et al. Bacillus clausii and gut homeostasis: state of the art and future perspectives. **Expert Review Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, n. 8, p. 943-948, 2016.

LIU, C. M. *et al*. Molecular and functional properties of protein fractions and isolate from cashew nut (*Anacardium occidentale L.*). **Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 23, n. 2, 2018.

LIU, D. *et al*. Survivability of *Lactobacillus rhamnosus* during the preparation of soy cheese. **Food Technology and Biotechnology,** v. 44, n. 3, p. 417-422, 2006.

MACHADO, A. L. B. **Desenvolvimento de extrato hidrossolúvel à base de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) e Macadâmia**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

MIRANDA, N. M. Z. de. **Caracterização probiótica de leveduras isoladas de queijo minas artesanal**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020.

MOLIMARD, P.; SPINNLER, H. E. Review: Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties. **Journal of Dairy Science**., v. 79, n. 2, p. 169-184, 1996.

MORAN, L. A. *et al*. Proteínas: estrutura tridimensioal e função. *In*: MORAN, L. A. *et al*. **Bioquímica**. 5 ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2013, p. 86-135.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NIELSEN, P.; FRITZE, D.; PRIEGST, F.G. Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. **Microbiology**, v. 141, p. 1754-1761, 1995.

NORO, G. **Síntese e secreção do leite**. 2001. Disponível em: https://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/sintese_leite.pdf. Acesso em: 10 set. 2022.

OLAYINKA, J. *et al*. Physicochemical, microbiological and sensory characteristics of cashew milk formulated yoghurt. **African Journal of Food Science**, v. 12, n. 8, p. 204-209, 2018.

ORDÓÑEZ, J. A. Proteínas. *In*: ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005, v. 1, p. 51-80.

ORDÓÑEZ, J. A. Queijos. *In*: ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005, v. 2, p. 85-103.

OYEYINKA, A. T.; ODUKOYA, J. O.; ADEBAYO, Y. S. Nutritional composition and consumer acceptability of cheese analog from soy and cashew nut milk. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, 2019.

PAIVA, F. D. A.; GARRUTTI, D.D. S.; DA SILVA NETO, R. M. Aproveitamento industrial do caju. **Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos**, 2000.

PAULA, J. C. J. de. *et al*. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 64, n. 367, p 19-25, 2009.

PAULETTO, F. B.; FOGAÇA, A. de. 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.

PERRY, K. S. P. Queijo: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Revista Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PESSOA, A. J.; KILIKIAN, B. V.; LUCARINI, A. C. Precipitação de proteínas. *In*: KILIKIAN, B. V.; PESSOA, A. J. **Purificação de produtos biotecnológicos: operações e processos com aplicação industrial**. 2 ed. São Paulo: Blucher, 2020.

PRETTO, A. N.; SANT'ANNA, V. Queijo serrano: uma visão cultural, de qualidade e legal. **Revista Vigilância Sanitária em Debate: sociedade, ciência & tecnologia**, v. 5, n. 4, p.81-87, 2017.

ROSA, T. D. **Atividades proteolíticas e microrganismos envolvidos na maturação do queijo serrano**. 2005. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, 2005.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p.1-16, 2006.

SALVETTI, S. et al. Rapid determination of vitamin B2 secretion by bactéria growing on solid media. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1255-1260, 2003.

SANDETS, M. E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. International **Dairy Journal, Amsterdam**, v. 8, p. 341-347, 1998.

SANTOS, D. F. dos.; AMÊNDOLA, I.; SANTOS, S. S. F. dos. *Bacillus clausii*: revisão de características e aplicações na medicina, biotecnologia e indústria alimentícia. **Revista Biociência**, Taubaté, v. 25, n. 2, p. 29-38, 2019.

SCHIMIDT, J. T. **Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo tofu utilizando coagulantes vegetais**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2016.

SCHINNER, M. N. **Artisan vegan cheese**: from every day to gourmet. Book Publishing Company, 2012.

SCHMITZ, A. C. **Elaboração e caracterização de extratos vegetais hidrossolúveis à base de castanha de caju e baru.** 2018. Monografia (graduação) – Universidade Federal da Fronteira Sul – Curso de Engenharia de Alimentos, Laranjeira do Sul, 2018.

SHARMA, P.; SHARMA, D.; AMIN, A. Development of a functional fermented peanut-based cheese analog using probiotic bacteria. **Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology**, v. 99, n.4, p. 435-441, 2018.

SILVA, N. N. *et al.* Micelas de caseína: dos monômeros à estrutura supramolecular. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, 2019.

SOARES, D.J. *et al*. Teor de minerais, baseado na Ingestão Diária Recomendada, em castanhas de caju obtidas dos cultivos convencional e orgânico em diferentes etapas de processamento **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1869-1876, 2012.

SOCIEDADE VEGETARIANA BRASILEIRA. **Mercado Vegetariano**. 2021. Disponível em: https://www.svb.org.br/vegetarianismo1/mercado-vegetariano#:~:text=No%20Brasil%2C%2014%25%20da%20popula%C3%A7%C3%A3o,este%20percentual%20sobe%20para%2016%25. Acesso em: 25 abr. 2022.

SOCIEDADE VEGETARIANA BRASILEIRA. **Vegetarianismo**. 2022. Disponível em: https://www.svb.org.br/vegetarianismo1/o-que-e. Acesso em: 28 mar. 2022.

SOUZA, C. F. V. de. **Evolução das características microbiológicas durante a elaboração e maturação do queijo serrano.** 2002. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de Agronomia, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

SUPERNOSSO. **Queijo minas frescal sensação de minas Kg**. Disponível em: https://www.supernosso.com/queijo-minas-frescal-sensacao-de-minas-kg/p. Acesso em: 01 dez. 2022.

TABANELLI, G. *et al*. Fermented nut-based vegan food: characterization of a homemade product and scale-up to an industrial pilot-scale production. **Journal of Food Science**, v. 83, 2018.

TAFFAREL, J. A. S. **Desenvolvimento de alimentos veganos tipo "queijo e tipo "requeijão"**. Monografia (graduação) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Curso de Engenharia de Alimentos, Porto Alegre, 2012.

TARDIOLI, P. W. **Hidrólise controlada de proteínas do soro de queijo usando carboxipeptidades A e alcalase imobilizadas multipontualmente em agarose**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, São Carlos, 2003.

THOMAS, T. D.; PRITCHARD, G. G. Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. **FEMS microbiology letters**, v. 46, n.3, p 245-268, 1987.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. **Vegan cheese market trends 2020 - 2030**. 2020. Disponível em: https://www.transparencymarketresearch.com/vegan-cheese-market.html. Acesso em: 25 abr. 2022.

TRIGUEIRO, A. Consumo, ética e natureza: o veganismo e as interfaces de uma política de vida. **Revista Internacional Interdisciplinar**, Florianópolis, v. 10, n. 1, p. 237-260, 2013.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of functional foods**, v. 9, p. 225-241, 2014.

URDACI, M. C.; BRESSOLLIER, P.; PINCHUK, I. *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities. **Journal of Clinical Gastroenterology,** v. 38, p. 86-90, 2004.

WALTER, H. E.; HARGROVE, R. C. **Cheese of the word.** Nova Iorque: Dover, 1972.

APÊNDICE A - Ficha de avaliação sensorial

IDADE: SEXO: DIETA: Vegana ( ) Vegetariana ( ) Onívora ( )

Você foi convidado a degustar dois alimentos tipo queijo. Prove as amostras e conceda as notas.

Escala 1		Característica	Amostra 1	Amostra 2
5	Gostei muito	Sabor		
4	Gostei moderadamente	Cor		
3	Não gostei nem desgostei	Textura		
2	Desgostei moderadamente	Aroma		
1	Desgostei muito	Aceitação global		
Comentários:				

Escala 2		Característica	Amostra 1	Amostra 2
5	Muito maior que o ideal	Salgado		
4	Moderadamente maior que o ideal	Acidez		
3	Ideal	Comentários:		
2	Moderadamente menor que o ideal			
1	Muito menor que o ideal			

Escala 3		Característica	Amostra 1	Amostra 2
5	Certamente compraria	Intenção de compra		
4	Provavelmente compraria	Comentários:		
3	Talvez compraria/ Talvez não compraria			
2	Provavelmente não compraria			
1	Certamente não compraria			