



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SANDRO RIOS SILVEIRA

DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO TECNOLÓGICA E PRODUÇÃO DE QUEIJO
A PARTIR DE COALHO ORIUNDO DA *Calotropis procera*

FORTALEZA

2020

SANDRO RIOS SILVEIRA

DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO TECNOLÓGICA E PRODUÇÃO DE QUEIJO A
PARTIR DE COALHO ORIUNDO DA *Calotropis procera*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S591d Silveira, Sandro Rios.

Desenvolvimento, validação tecnológica e produção de queijo a partir de coalho oriundo da *Calotropis procera* / Sandro Rios Silveira. – 2020.

151 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Márcio Viana ramos.

1. Proteases vegetais. 2. Queijo. 3. Lactovegetariano. 4. Quimosina. I. Título.

CDD 660.6

SANDRO RIOS SILVEIRA

DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO TECNOLÓGICA E PRODUÇÃO DE QUEIJO A
PARTIR DE COALHO DE ORIGEM VEGETAL INÉDITO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aprovada em: 03/04/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Sueli Rodrigues
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Lucicléia Barros de Vasconcelos Torres
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dra. Mirele da Silveira Vasconcelos
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

A Deus

Aos meus pais, Silveira e Ancila

A minha esposa Tania

“Temos o destino que merecemos. O nosso destino está de acordo com os nossos méritos.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela saúde e paz concedida nos momentos mais difíceis, aos espíritos de luz pelo discernimento e clareza das coisas.

Aos meus pais prof. José Silveira e Ancila Maria, pelos ensinamentos de vida, conselhos e inspiração. A eles, agradeço tudo que sou hoje. A minha esposa Tânia Macêdo, companheira nas caminhadas dessa vida, nos momentos de felicidade e intranquilidade. A ela também dedico mais essa vitória.

Aos meus avôs Mestre Silveira (*in memorian*) e Raimundo Clóvis (*in memorian*), ainda pelos curtos momentos de convivência, mas que marcaram pela simplicidade, honestidade e inteligência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Márcio Viana Ramos, pela solicitude, ensinamentos e dedicação prestada em todo decurso dessa tese, agradeço também pelos ricos momentos de descontração através das conversas e brincadeiras sobre assuntos diversos, momentos esses que levarei em minhas lembranças. Ao professor Cléverson Diniz Teixeira de Freitas pela parceria e orientações, fundamentais na realização dessa pesquisa.

Aos professores participantes da banca examinadora Dr. Renato de Azevedo Moreira, Dra. Sueli Rodrigues, Dra. Lucicléia Barros Vasconcelos Torres e Dra. Mirele da Silveira Vasconcelos, pelas valorosas sugestões e colaborações.

As professoras Mirele da Silveira Vasconcelos e Camila Freitas pela parceria em parte das análises realizadas nessa tese.

Aos amigos e integrantes do laboratório de Biotecnologia do Látex Vegetal-BIOLÁTEX, Mestres: Júnior, Wallace, Mauro, Eilton, Daniel, Liviane, Débora, Zelândia, Camila, João Pedro, Carol, Ayrles e Brandon todos que nesses quatro anos de uma forma ou de outra contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

A Dra. Dinalva Queiroz pela parceria desde o nascedouro de meu primeiro projeto.

A empresa de Laticínios Lá de Casa na pessoa da proprietária Marta Rochelle, pela parceria no desenvolvimento do produto final e de sua engenheira de

alimentos Georgina, sempre disponível a ajudar e auxiliar em todo processo de produção desenvolvido.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Governo do Estado do Ceará através da Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, por ter financiado essa pesquisa através da concessão da bolsa de estudos e do edital INOVAFIT, de suma importância na formação do elo universidade-setor privado.

À Secretaria de Educação do Ceará – SEDUC, pela concessão da liberação de minhas atividades laborais e assim poder me dedicar de forma exclusiva a esse trabalho.

RESUMO

Atualmente, a média brasileira *per capita* de consumo de queijos é de 5,4 quilos, acredita-se que até o final de 2020, o consumo será de 7,5 quilos *per capita*. Verifica-se um crescimento do mercado dos queijos denominados “especiais” por apresentarem diferenciais em sua formulação, geralmente quanto ao coagulante ou tipo de leite utilizado. Enzimas de origem vegetal com potencial biotecnológico de produzir queijos, tem sido amplamente prospectadas, atendendo a mercados específicos como dos lactovegetarianos, parcela de consumidores com dieta livre de proteínas ou subprodutos de origem animal, com exceção do leite. Somente uma marca de queijo comercializado no mundo utiliza um coagulante de origem vegetal, o queijo Serra da Estrela produzido em Portugal, utilizando um coagulante extraído das flores do Cardo (*Cinara cardunculus*), porém apresenta um valor agregado considerado alto para o mercado brasileiro. Esse trabalho consistiu no desenvolvimento e padronização de um coalho de origem vegetal, a partir do látex de *Calotropis procera* em parceria com um laticínio, seguindo protocolo industrial. Análises físico químicas e bacteriológicas foram realizadas no queijo lactovegetariano utilizando queijo coalho comercial como controle, somente os parâmetros umidade (%), cinzas(%) e valor calórico (kcal/100g) apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). As análises microbiológicas seguiram a RDC 12/2001 (ANVISA), em relação a coliformes termotolerantes (45°C), *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*, apresentando tanto o queijo lactovegetariano quanto o coalho comercial, limites de acordo com os valores preconizados. Imunoensaio de ELISA realizado no leite, coalho de origem vegetal, lactosoro e queijo lactovegetariano não detectou quantidades residuais de proteases, comprovando a ausência de caráter alergênico no queijo. Análise sensorial com 109 participantes foi realizada no queijo lactovegetariano, seguindo uma escala hedônica de valores (0 a 9), em todos os atributos sensoriais, obteve nota superior a 7,0 com média de impressão global 8,02. O índice de aceitação (IA) calculado, variou entre 84,71 a 93,99% estando bem acima do índice de aceitabilidade (70%), que indica boa aceitação do produto.

Palavras-chave: Proteases vegetais. Queijo. Lactovegetariano. Quimosina.

ABSTRACT

Currently, the Brazilian average consumption of cheese per capita is 5.4 kg, it is believed that by the end of 2020, consumption will be 7.5 kg per capita. The market for so-called "special" cheeses is growing, they usually have differences in their formulation, such as the coagulant or type of milk used. Vegetable enzymes with biotechnological potential to produce cheeses have been widely prospected, serving specific markets such as lactovegetarians, a portion of consumers with a protein-free diet or animal by-products, except for milk. Only one brand of cheese sold worldwide uses a coagulant of vegetable origin, the Serra da Estrela cheese produced in Portugal, using a coagulant extracted from thistle flowers (*Cynara cardunculus*), but has an added value considered high for the Brazilian market. This work consisted in the development and standardization of a coagulant of vegetable origin, from the *Calotropis procera* latex in partnership with a dairy manufacturer, following industrial protocols. Physical, chemical and bacteriological analyses were performed on lactovegetarian cheese using commercial rennet cheese as control, only the parameters humidity (%), ash (%) and caloric value (kcal/100g) showed significant statistical differences ($p < 0.05$). Microbiological analyses followed the RDC 12/2001 (ANVISA), in relation to thermotolerant coliforms (45°C), *Salmonella sp.* and *Escherichia coli*, was present in both lactovegetarian cheese and commercial rennet, below the recommended limit values. ELISA immunoassay performed on milk, rennet of vegetable origin, lactoserum and lactovegetarian cheese did not detect residual amounts of proteases, proving the absence of allergenic character in the cheese. Sensory analysis with 109 participants was performed on lactovegetarian cheese, following a hedonic scale (values of 0 to 9), in all sensory attributes, the lactovegetarian cheese obtained a score higher than 7.0 with an average overall impression of 8.02. The calculated acceptance index (AI) ranged from 84.71 to 93.99% being well above the acceptance index (70%), which indicates good acceptance of the product.

Keywords: Plant proteases. Cheese. Lactovegetarian. Chymosin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Tamanho do mercado de queijos no Brasil	22
Figura 2	– Participação das categorias no volume total de produção de queijos no Brasil	23
Figura 3	– Penetração de diferentes tipos de queijos no mercado brasileiro	23
Figura 4	– Queijo Serra da Estrela (Portugal)	24
Figura 5	– Etapas básicas de fabricação de queijo do tipo coalho	27
Figura 6	– Proteólise da caseína do leite pela enzima quimosina	30
Figura 7	– Canais laticíferos não anastomosados de uma haste de Moonflower (<i>Ipomoeae alba</i> L.)	43
Figura 8	– Exsudação e coleta do látex de <i>Calotropis procera</i>	44
Figura 9	– Planta <i>Calotropis procera</i>	47
Figura 10	– Processamento do Látex de <i>Calotropis procera</i>	51
Figura 11	– Mapa dos pontos de coleta georreferenciados em Fortaleza e região metropolitana	55
Figura 12	– Teste de estabilidade do coalho de origem vegetal	62
Figura 13	– Estudo de solubilidade do coalho de origem vegetal	63
Figura 14	– Variação mensal da solubilidade do coalho vegetariano reconstituído em água após 12 meses	64
Figura 15	– Atividade proteolítica mensal do coalho de origem vegetal ao longo de 12 meses	65

Figura 16 – Atividade específica de um lote de coalho vegetariano armazenado por 12 meses	66
Figura 17 – Atividade específica do coalho de origem vegetal coletado por 12 meses em 10 pontos geograficamente distintos	67
Figura 18 – Perfil eletroforético do coalho de origem vegetal coletado em 10 pontos de coleta distintos	69
Figura 19 – Cromatografias das amostras de coalho vegetariano em situações de sazonalidade climática e geográfica distintas	71
Figura 20 – Autólise e atividade proteolítica residual (%) do coalho de origem vegetal	73
Figura 21 – Processo de coagulação do leite (A) e corte da coalhada (B) na produção de queijo “piloto” lactovegetariano	81
Figura 22 – Processamento in loco de queijo lactovegetariano	82
Figura 23 – Aspecto geral na formação de coágulos no leite ao se utilizar coalho de origem vegetal e coalhos comerciais	83
Figura 24 – Imagens através de Microscopia de Força Atômica (AFM) no modo de amplitude das micelas de caseína do leite após incubação com coalho de origem vegetal em diferentes tempos	85
Figura 25 – Imunodeteccção (ELISA) das proteínas do látex de <i>C. procera</i> (PLCp) no queijo lactovegetariano e lactosoro, utilizando anticorpos policlonais anti-PLCp	91
Figura 26 – Imunodeteccção (ELISA) de proteases do látex de <i>C. procera</i> (Cp) no queijo lactovegetariano e lactosoro, utilizando anticorpos policlonais antiproteaseCp	93
Figura 27 – Produção do queijo lactovegetariano na indústria	99
Figura 28 – Queijos de coalho lactovegetariano e comercial	105
Figura 29 – Preparação e apresentação das amostras aos provadores na análise sensorial do queijo lactovegetariano	116
Figura 30 – Análise sensorial do queijo lactovegetariano	117

Figura 31 – Frequência de consumo de queijo dos provadores da análise sensorial	120
Figura 32 – Intenção de compra dos provadores em relação ao queijo lactovegetariano	121
Figura 33 – Índice de aceitabilidade (IA) obtido na análise sensorial do queijo lactovegetariano	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média e variação dos componentes do leite de bovinos	18
Tabela 2 – Lista de enzimas de origem vegetal	35
Tabela 3 – Características das principais classes de proteases	39
Tabela 4 – Lista de enzimas utilizadas na indústria de alimentos e respectivas fontes de obtenção	41
Tabela 5 – Classificação taxonômica da planta <i>Calotropis procera</i>	46
Tabela 6 – Pontos de coleta	55
Tabela 7 – Pontos e zonas de coleta	56
Tabela 8 – Calendário de coletas	56
Tabela 9 – Estudo da atividade específica do coalho de origem vegetal, quando coletado em zonas diferentes e em situações climáticas distintas	68
Tabela 10 – Composição centesimal (%) do coalho de origem vegetal	75
Tabela 11 – Contaminantes inorgânicos (metais pesados) presentes no coalho de origem vegetal	76
Tabela 12 – Análise microbiológica realizada no leite, Coalho vegetal, queijo vegetariano e queijo comercial	77
Tabela 13 – Tempo de coagulação do coalho de origem vegetal	84
Tabela 14 – Dados sobre ensaio de coagulação utilizando coalho de origem vegetal e coagulantes comerciais	85
Tabela 15 – Poder de Coagulação do coalho de origem vegetal e coagulantes comerciais	86
Tabela 16 – Análise microbiológica realizada no leite, coalho de origem vegetal, queijo lactovegetariano e queijo coalho comercial	94
Tabela 17 – Análises físico-químicas dos queijos lactovegetariano (QLV) e queijo coalho comercial (QCC)	106

Tabela 18 – Resultados das análises de perfil de textura (TPA) nos queijos lactovegetariano (QLV) e coalho comercial (QCC)	110
Tabela 19 – Médias de aceitação atribuídas para a amostra de queijo lactovegetariano em relação aos atributos cor, aparência, aroma, textura, sabor e impressão global.....	122

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Objetivos Específicos	21
3	REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1	Mercado de Queijos no Brasil	22
3.2	Mercado dos produtos lactovegetarianos	24
3.3	Queijo	25
3.4	Leite	28
3.5	Coagulação Enzimática do Leite	29
3.5.1	<i>Mecanismo de coagulação</i>	29
3.5.2	<i>Tamanhos das micelas x coagulação do leite</i>	31
3.6	Coagulantes (coalhos)	32
3.7	Prospecção de enzimas coagulantes e seu uso na fabricação de queijos	33
3.8	Proteases	37
3.8.1	<i>Classificação das proteases</i>	37
3.8.2	<i>Fontes de obtenção</i>	39
3.8.3	<i>Enzimas certificadas para uso na indústria alimentícia</i>	40
3.9	Látex	42
3.9.1	<i>Composição Química do látex</i>	44
3.10	Plantas laticíferas	44
3.10.1	<i>Família Apocynaceae</i>	45
3.10.1.1	<i>Calotropis procera</i>	46
4	MATERIAIS	49
4.1	Reagentes	49
4.2	Equipamentos	49
4.3	Material Vegetal	49
4.4	Coalho de Origem Vegetal	49

5	COLETA, PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS DO LÁTEX (PL) UTILIZADAS COMO COALHO DE ORIGEM VEGETAL	50
5.1	Metodologia	50
5.1.1	<i>Coleta e processamento do látex</i>	50
5.1.2	<i>Caracterização Bioquímica</i>	52
5.1.2.1	<i>Avaliação da Estabilidade do Coalho Vegetariano - Teste de Prateleira</i>	52
5.1.2.2	<i>Variabilidade sazonal e temporal nas coletas do látex de Calotropis procera</i>	54
5.1.2.3	<i>Autólise</i>	59
5.1.2.4	<i>Análises físico-químicas e microbiológicas</i>	59
5.1.2.4.1	Composição Centesimal	60
5.1.2.4.2	Teor de Metais	61
5.1.2.4.3	Análises microbiológicas	61
5.2	Resultados e Discussões	61
5.2.1	<i>Avaliação da Estabilidade do Coalho Vegetariano - Teste de Prateleira</i>	62
5.2.2	<i>Variabilidade sazonal e temporal nas coletas de Calotropis procera</i>	66
5.2.3	<i>Autólise</i>	73
5.2.4	<i>Análises físico-químicas e microbiológicas</i>	74
5.2.4.1	<i>Composição centesimal</i>	74
5.2.4.2	<i>Teor de Metais</i>	75
5.2.4.3	<i>Análises Microbiológicas</i>	76
5.3	Conclusão	78
6	UTILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO LÁTEX DE Calotropis procera COMO COALHO DE ORIGEM VEGETAL NA FABRICAÇÃO DE QUEIJOS	79
6.1	Metodologia	79
6.1.1	<i>Atividade de coagulação do leite</i>	79
6.1.2	<i>Poder ou força de coagulação</i>	79

6.1.3	<i>Fabricação in loco do queijo formulado com coalho de origem vegetal</i>	80
6.2	Resultados e Discussões	83
6.2.1	<i>Atividade de coagulação do leite</i>	83
6.2.2	<i>Poder ou força de coagulação</i>	86
6.3	Conclusão	88
7	ANÁLISES DO QUEIJO LACTOVEGETARIANO E LACTOSORO	89
7.1	Metodologia	89
7.1.1	<i>Preparação das amostras</i>	89
7.1.2	<i>Estudo Comparativo entre os queijos Lactovegetariano (QLV) e Queijo Coalho Comercial (QCC)</i>	89
7.1.2.1	<i>Detecção de proteínas laticíferas nos queijos e lactosoro</i>	89
7.1.2.2	<i>Análise microbiológica dos queijos</i>	90
7.2	Resultados e discussões	91
7.2.1	<i>Detecção de proteínas laticíferas nos queijos e lactosoro</i>	91
7.2.2	<i>Análise microbiológica dos queijos</i>	94
7.3	Conclusão	96
8	PRODUÇÃO E ANÁLISES DO QUEIJO LACTOVEGETARIANO EM PROTOCOLO INDUSTRIAL	97
8.1	Metodologia	97
8.1.1	<i>Produção do Queijo</i>	97
8.1.2	<i>Análises físico químicas</i>	100
8.1.3	<i>Perfil de textura (TPA)</i>	103
8.1.4	<i>Análises Microbiológicas</i>	104
8.2	Resultados e Discussões	105
8.2.1	<i>Produção do queijo lactovegetariano na indústria</i>	105
8.2.2	<i>Análises físico-químicas</i>	106
8.2.3	<i>Perfil de Textura (TPA)</i>	109
8.2.4	<i>Análises Microbiológicas</i>	111
8.3	Conclusões	113
9	ANÁLISE SENSORIAL DO QUEIJO LACTOVEGETARIANO PRODUZIDO COM COALHO DE ORIGEM VEGETAL	114
9.1	Metodologia	114

9.1.1	<i>Análise Sensorial do queijo lactovegetariano</i>	114
9.1.2	<i>Caracterização dos Provedores</i>	115
9.1.3	<i>Preparação das Amostras</i>	115
9.1.4	<i>Teste de Aceitação</i>	116
9.1.5	<i>Cálculo do Índice de Aceitação (IA)</i>	118
9.2	Resultados e Discussões	119
9.2.1	<i>Perfil dos provedores</i>	119
9.2.1.1	<i>Intenção de compra e teste de aceitação</i>	120
9.2.1.2	<i>Índice de Aceitação (IA)</i>	122
9.3	CONCLUSÃO	124
10	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	125
11	OUTRAS CONTRIBUIÇÕES	126
	REFERÊNCIAS	127
	ANEXO A – LAUDO TEOR DE METAIS REALIZADO NO COALHO DE ORIGEM VEGETAL	142
	ANEXO B – ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO COALHO DE ORIGEM VEGETAL	144
	ANEXO C – ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO LACTOVEGETARIANO	145
	ANEXO D – ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO LEITE PASTEURIZADO	146
	ANEXO E – ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO CONTROLE COMERCIAL	157
	ANEXO F – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	158
	APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO DE RECRUTAMENTO DA ANÁLISE SENSORIAL DO QUEIJO LACTOVEGETARIANO	151
	APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO DE ACEITAÇÃO DO QUEIJO LACTOVEGETARIANO	152

1 INTRODUÇÃO

O queijo do tipo coalho é um dos mais tradicionais produtos lácteos produzidos no nordeste brasileiro, trata-se de um produto de importante impacto socio econômico, com expressiva participação na fonte de renda e geração de emprego local. Grande parte de sua produção, mesmo nos dias atuais, ocorre de forma artesanal principalmente em pequenas localidades situadas em zona rural, sua produção/manufatura não agrega tecnologias e muitas vezes utiliza leite cru e coalho de origem animal, oriundo do estômago de bezerros em lactação, cuja enzima responsável é a quimosina.

O mercado de enzimas coagulantes tem crescido em todo o mundo, seja na forma de quimosina de origem animal ou na forma microbiana, através de técnicas de biologia molecular. Paralelo ao mercado de enzimas, cresce o mercado e consumo de queijos, em 2017 o consumo *per capita* no Brasil foi de 5,4 quilos e a projeção para 2020 é de 7,5 quilos por pessoa. Existe ainda um *nicho* de mercado aos denominados queijos “especiais”, onde na grande totalidade diferenciam pela origem ou tipo de coagulante utilizado, pois a matéria prima principal é o leite, geralmente de vaca ou de ovelha.

Segundo Leite, 2016 quando estudou plantas laticíferas como *Calotropis procera*, *Cryptostegia grandiflora*, *Plumeria rubra* e *Himatanthus drásticus*, verificou potencial biotecnológico de coagulação do leite principalmente das espécies *C. procera* e *C. grandiflora*.

O apelo biotecnológico por alimentos que possam agregar insumos ou tecnologias que os tornem viáveis a um determinado mercado, tem convergido na fabricação de queijos e derivados lácteos, que possam atender a situações de restrição alimentar como a intolerância à lactose e consumo de produtos de origem animal, esse último tem alavancado um número maior de adeptos como os vegetarianos, veganos, lactovegetarianos e outros, dessa forma a procura por queijos que atendam à essas necessidades, tem incentivado pesquisas aos chamados queijos lactovegetarianos.

Somente uma marca de queijo do tipo lactovegetariano é comercializada no mundo, denominado Serra da Estrela, cuja matéria prima principal é o leite de ovelhas

e coagulante extraído das flores do cardo (*Cynara cardunculus*), produzido em Portugal desde o sec. XV, chega às principais casas especializadas no Brasil ao preço médio de R\$210,00 uma embalagem de \pm 700g, o que o torna um produto “especial”, de valor agregado considerado alto para o mercado local.

Dessa forma, produzir um queijo do tipo coalho lactovegetariano, utilizando coagulante vegetal oriundo do látex de *Calotropis procera*, de fácil coleta e grande biodisponibilidade, oferece um produto de fácil obtenção, pois segue mesmo protocolo industrial do queijo coalho tradicional, e a preço estimado em torno de R\$ 50,00/Kg bem mais acessível ao mercado brasileiro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver, validar e produzir um queijo lactovegetariano utilizando coalho de origem vegetal obtido do látex de *Calotropis procera*.

2.2 Objetivos Específicos

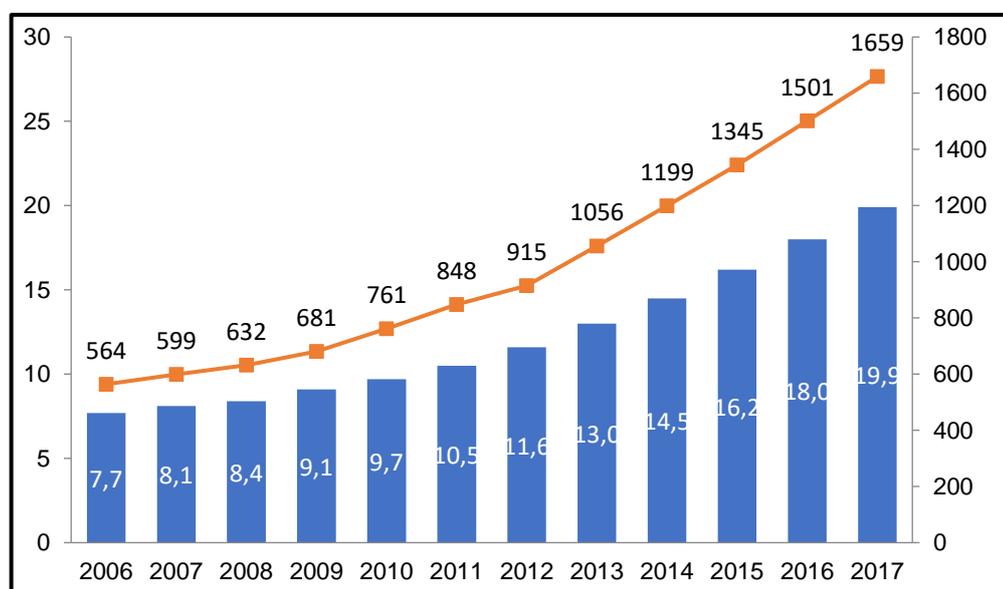
- Verificar melhores áreas e época do ano em que se possa coletar o látex de *Calotropis procera*, levando em consideração rendimento, perfil cromatográfico e atividade de suas enzimas;
- Realizar ensaio de estabilidade das proteínas do látex (PL) de *C. procera* ao ser armazenada por 12 meses, em condições controladas de temperatura e luminosidade;
- Realizar ensaios de coagulação do leite *in loco* utilizando coalho de origem vegetal, testando concentrações e quantidades diferentes, que vise coagular o leite de forma eficiente e eficaz;
- Produzir de forma artesanal queijo lactovegetariano, realizando análises físico química, bioquímica e bacteriológica;
- Estabelecer parceria com empresas privadas do ramo de laticínios e fabricação de queijos, que possa viabilizar pesquisas e produção do queijo lactovegetariano;
- Produzir na indústria queijo lactovegetariano utilizando protocolo industrial;
- Realizar análises microbiológicas e de textura no queijo lactovegetariano produzido na indústria, utilizando queijo do tipo coalho comercial como controle;
- Planejar e executar análise sensorial do queijo lactovegetariano;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Mercado de Queijos no Brasil

Segundo a especialista internacional em inteligência de mercado, MINTEL o mercado brasileiro de queijos, que cresceu em volume 9,4% ao ano e em faturamento total 7,7% ao ano no período de 2006 a 2013, deverá aumentar seu ritmo de crescimento até 2017. A projeção da empresa de pesquisa Milkpoint é de que os volumes vendidos cresçam, em média, 11,4% ao ano entre 2014 e 2017, e os valores anuais de venda 11,1% ao ano, no mesmo período (FIGURA 1).

Figura 1 - Tamanho do mercado de queijos no Brasil.



Fonte: Milkpoint (2017)

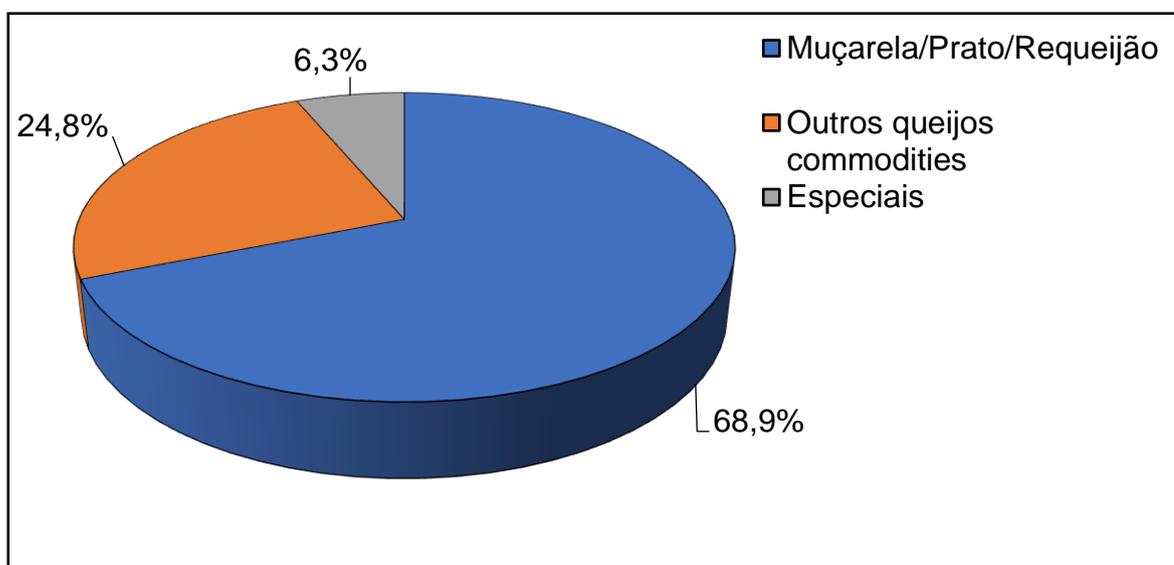
■ Valor (R\$ Bilhões) ■ Volume (1.000 Tons)

Atualmente, a média brasileira *per capita* de consumo de queijos é de 5,4 quilos, acredita-se que em 2020, o consumo será de 7,5 quilos *per capita* e para 2030 a projeção é de 9,6 quilos de queijo por habitante/ano. Na Argentina e Uruguai, o consumo é de 11 quilos per capita. (MILKPOINT, 2017). Apesar de não existir dados estatísticos oficiais da produção e consumo específicos do queijo coalho no Nordeste ou no Ceará, acredita-se que tanto a produção como o consumo do queijo coalho sejam parecidos como cenário descrito anteriormente (MILKPOINT, 2017).

Outro dado importante da pesquisa realizada trata do perfil de consumo de queijos no Brasil, muito baseado em queijos “convencionais”, como o muçarela, o queijo prato e o requeijão. Esta informação é confirmada pelos dados da ABIQ

(Associação Brasileira das Indústrias de Queijo) sobre a participação das diferentes categorias de queijos no total produzido no país, quase 70% do volume é produzido em muçarela, queijo prato e requeijão (FIGURA 2).

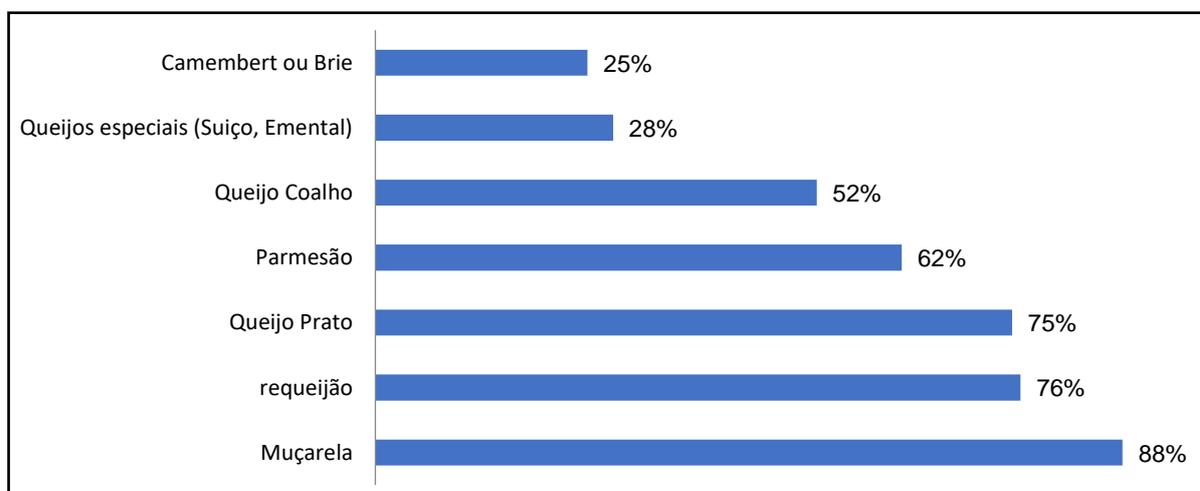
Figura 2 - Participação das categorias no volume total de produção de queijos no Brasil.



Fonte : ABIQ/MILKPOINT (2016).

Uma informação interessante da pesquisa realizada pela MINTEL indica a penetração de diferentes tipos de queijos; numa amostra de 1.500 adultos acima de 16 anos, verifica-se o percentual de entrevistados que já consumiu cada tipo de queijo. A conclusão é de que há muitas oportunidades de crescimento da penetração (e, portanto, do consumo) de queijos de maior valor agregado (FIGURA 3).

Figura 3 - Penetração de diferentes tipos de queijos no mercado brasileiro .



Fonte: Milkpoint (2016)

O queijo coalho é um alimento típico do nordeste brasileiro, destacando-se o Ceará, Rio Grande do Norte, Parnaíba e Pernambuco como maiores produtores e consumidores (NASSU *et al.*, 2006). No Ceará, o queijo coalho é amplamente consumido na forma natural, assado ou frito, ou ainda em preparações de comidas típicas, como o feijão verde. A sua importância econômica e social é evidente para o estado do Ceará, principalmente, entre pequenos produtores do interior do estado, isso por que a sua produção é simples e não exige tecnologias ou equipamentos sofisticados (NASSU *et al.*, 2006).

3.2 Mercado dos produtos lactovegetarianos

No Brasil segundo última pesquisa do IBOPE (2018), estimou-se que a porcentagem de vegetarianos é de 14%, apresentando um crescimento de 75% em relação à 2012 e esse número cresce quando variações menos restritas do vegetarianismo como os lactovegetarianos, pessoas que não consomem carnes nem ovos, porém mantêm em suas dietas produtos lácteos desde que não apresentem coagulantes ou qualquer aditivo de origem animal.

Existe apenas um queijo formulado com coalho de origem vegetal comercializado no mundo. Esse queijo, denominado queijo Serra da Estrela, é produzido exclusivamente em Portugal na "Região Demarcada de Produção de Queijo Serra da Estrela". Esse queijo é produzido com leite de ovelhas, no inverno e por mulheres, de maneira totalmente artesanal. O tempo de cura dura cerca de 60 a 120 dias em câmaras com temperatura e umidade controladas. O coalho utilizado é extraído de flores da planta *Cynara cardunculus*. (FIGURA 4).

Figura 4 – Queijo Serra da Estrela (Portugal)



Fonte: <https://www.bancadoramon.com.br/queijo-serra-da-estrela>

Uma embalagem de aproximadamente 700 g deste queijo, custa R\$ 210,00 e apesar do alto custo, existe mercado para esse queijo na nossa região.

Em pesquisa recente no ano de 2018 e publicada da revista *Dairy Foods Magazine* de acordo com o *2018 Cheese Outlook Study*, observa-se o crescente mercado dos chamados queijos especiais, apontando para os próximos 24 meses, mais de um terço das empresas entrevistadas planejam adicionar ou comprar mais culturas (40%) e/ou enzimas (36%), enquanto quase um quinto (19%) pretende adicionar ou comprar mais anti aglutinantes, corantes e/ou ingredientes de sabor.

3.3 Queijo

Queijo é um produto lácteo produzido em grande variedade tanto de sabor quanto de forma em todo o mundo. É comumente aceito que o queijo surgiu no crescente fértil entre os rios Tigres e Eufrates, no Iraque, há 8.000 anos, durante a chamada revolução agrícola, ocorrida com a domesticação de plantas e animais (PAULA *et al.*, 2009).

No Brasil, o Regulamento Técnico de Identidade e qualidade dos queijos, regulamentado pela Instrução Normativa nº 30 de 2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, define queijo de coalho, o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação (BRASIL, 2001).

Sendo o leite uma excelente fonte de nutrientes para as bactérias que o contaminam, algumas delas utilizam o seu açúcar (lactose) como fonte de energia produzindo ácido láctico, são denominadas bactérias lácticas e crescem bem à temperatura ambiente.

O mecanismo de coagulação do leite na fabricação de queijos inicia-se quando uma quantidade suficiente de ácido é produzida, a principal proteína do leite (caseína) coagula no seu ponto isoelétrico (pH 4,6), dando origem a um gel que prende a gordura a fase aquosa.

A produção de queijo é basicamente um processo de concentração do leite no qual parte dos componentes sólidos, principalmente proteína e gordura, são concentrados na coalhada enquanto as proteínas do soro, lactose e sólidos solúveis, são removidos no soro. O soro de leite é a porção aquosa que se separa da massa

durante a fabricação convencional de queijos, e que retém cerca de 55% dos nutrientes do leite.

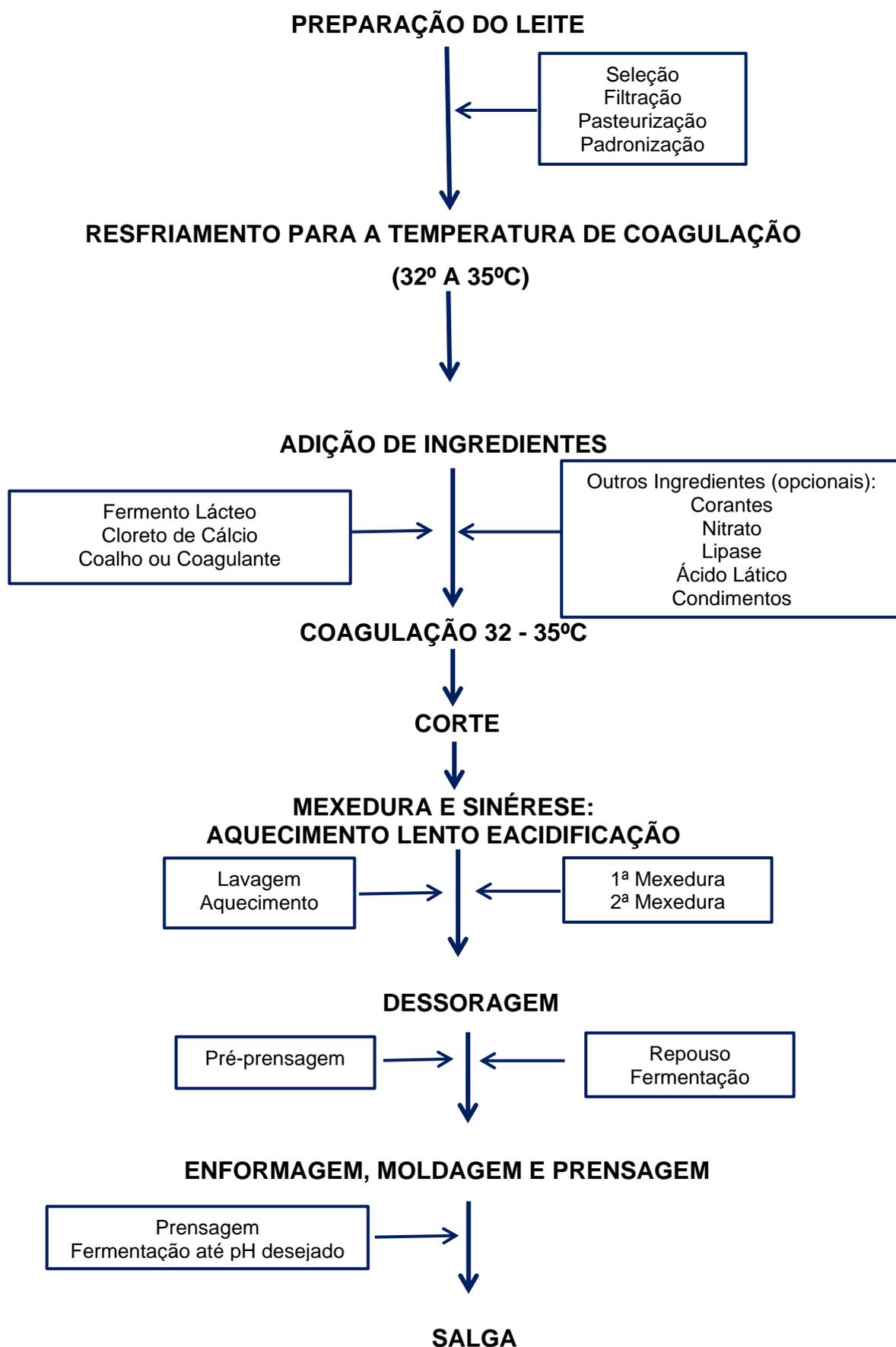
Aproximadamente de 85 a 90% do volume de leite utilizado na fabricação de queijos resulta em soro, que contém grande parte dos sólidos representados por proteínas, sais minerais, vitaminas e, principalmente, lactose. Aproximadamente 75% das proteínas do leite são aproveitadas em queijos obtidos por coagulação enzimática, o restante é perdido no soro (KOSIKOWSKI, 1982; FOX e MCSWEENEY, 1998; WALSTRA *et. al.*, 1999).

O objetivo da fabricação de queijo é produzir um produto atrativo e durável, com determinadas características de sabor, aroma e textura que são adquiridas quando o queijo é deixado maturar sob condições apropriadas.

Várias etapas ou grupos de etapas estão envolvidos na conversão do leite em queijo, das quais as principais são: coagulação, acidificação, dessoramento do grão (sinérese), enformagem e salga. Intervindo nessas etapas, o queijeiro pode controlar a composição do queijo, que vai influenciar diretamente na sua maturação e na qualidade final do produto (de PAULA, J.C.J. *et al.*, 2009).

Segundo Araújo *et al.*, 2011; Marquardt *et al.*, 2013, o processo de elaboração de queijo coalho é simples e de domínio público, no entanto, alguns princípios básicos devem ser observados para obtenção de um produto de qualidade. A adição de ingredientes, a observação do ponto de corte da coalhada, a dessoragem e a salga são processos importantes durante a fabricação (FIGURA 5).

Figura 5 – Etapas básicas de fabricação de queijo do tipo coalho.



Fonte: Adaptado de Fox *et. al.*, (2000).

3.4 Leite

A qualidade do leite de bovinos, caprinos ou ovinos, destinado às indústrias de produtos lácteos em especial as queijarias, representa grande influência na textura, sabor e odor dos queijos. Teor de gordura e principalmente a acidez do leite, são responsáveis desde a um eficiente processo de coagulação, quanto a um produto de melhor aceitação no mercado de queijos.

Segundo a Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), leite é o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições higiênicas, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. Deve ser homogêneo e exibir coloração branca opalescente (BRASIL, 2011).

“Entende-se por leite de qualidade aquele leite cuja composição química (sólidos totais, gordura, proteína, lactose e minerais), microbiológica (contagem total de bactérias), organoléptica (sabor, odor, aparência) e número de células somáticas, atendam os parâmetros de qualidade exigidos internacionalmente, deve ainda, ser isento de resíduos de antibióticos, desinfetantes ou adulterantes e ser originado de rebanhos com sanidade controlada” (KROLOW, 2006).

A produção e a qualidade do leite são determinadas por parâmetros de manejo adequado, composição físico química e higiene (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

O leite de vacas é composto por água, gordura, proteínas, lactose, minerais e vitaminas. Os componentes do leite, com exceção da água, constituem os sólidos totais e são responsáveis pelo seu valor nutricional. O teor de sólidos determina o valor industrial do leite, pois quanto mais gordura e proteína, maior o rendimento na produção dos derivados lácteos. A média e variação dos componentes do leite bovino estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Média e variação dos componentes do leite de bovinos.

Componentes	Média (%)	Variação (%)
Água	87,2	85,5 - 88,7
Gordura	3,9	2,4 - 5,5
Sólidos não gordurosos	8,8	7,9 - 10,0
Proteína	3,25	2,8 - 4,5
Lactose	4,6	3,5 - 6,0

Fonte: Dias (2014)

O teste do alizarol, é um dos métodos mais utilizados na avaliação da acidez do leite, trata-se de um teste de natureza qualitativa, realizado na própria propriedade rural. Além de análises físico químicas, a legislação obriga inspeções quanto aos padrões higiênico-sanitários (contagem total bacteriana, contagem de células somáticas, detecção de resíduos de antibióticos).

Os parâmetros higiênico-sanitários refletem a saúde dos animais, com ênfase na mastite, ausência de resíduos químicos e as condições de obtenção e armazenamento do leite (DIAS, 2014).

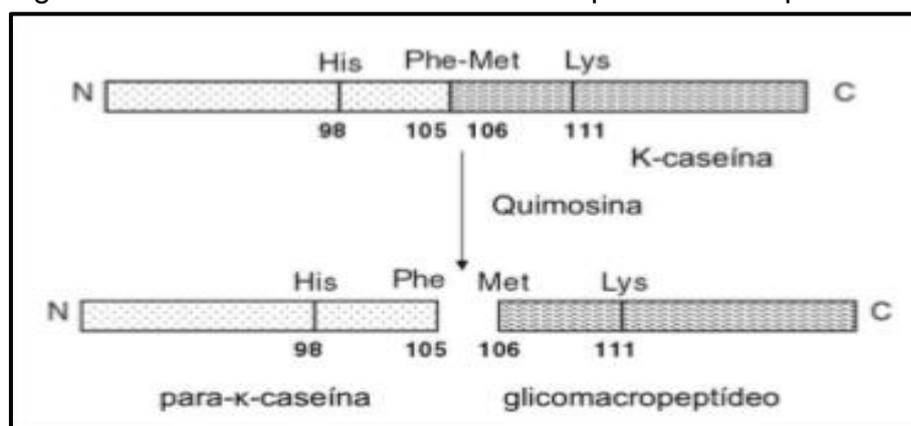
3.5 Coagulação Enzimática do Leite

3.5.1 Mecanismo de coagulação

A coagulação enzimática envolve a modificação da micela de caseína através da proteólise limitada, promovida pela ação de enzimas coagulantes específicas, seguida da agregação das micelas por ligações com o cálcio (FOX; MCSWEENEY, 1998). O mecanismo deste tipo de coagulação pode ser dividido em duas fases: a primeira refere-se à hidrólise enzimática e a segunda à agregação das micelas de caseína (LUCY, 2011). A coagulação enzimática da proteína do leite pode ser dividida em dois momentos ou fases, efetuada por meio de enzimas de origem animal, vegetal e microbiana, sendo a quimosina a de maior especificidade na clivagem de caseínas. No primeiro momento, designado fase primária ou enzimática,

logo após a adição do agente coagulante, ocorre a hidrólise da ligação peptídica existente entre a fenilalanina (105) e metionina (106) da κ -caseína (Phe105-Met106), com conseqüente liberação do glicomacropéptido (ALMEIDA, 2006; ALVARENGA, 2008) (FIGURA 6).

Figura 6 – Proteólise da caseína do leite pela enzima quimosina.



Fonte : Yegin *et al.* (2011)

Nesse momento, esta ação promove a divisão da κ -caseína em dois resíduos, o resíduo glicomacropéptido, solúvel, hidrofílico, constituído pelos aminoácidos 106-169 ficando agregado ao soro, e o resíduo *para*- κ -caseína, insolúvel, hidrofóbico, constituído pelos aminoácidos 1-105, ligado α S1- e β -caseínas e, por ser altamente hidrofóbico e alcalino, conduz a desestabilização das micelas.

A caseína é formada em proporções (4:1:4:1), por α S1-CN (38%), α S2-CN (10%), β -CN (35%) e κ -CN (15%). A α S1- é formada por uma cadeia de 199 resíduos de aminoácidos, a α S2- por 207, a β por 209 e a κ -CN por 169, com pesos moleculares de 23, 25, 24 e 19 kDa, respectivamente (DALGLEISH, 2011).

A partir da liberação do glicomacropéptido, verifica-se uma redução importante da carga das micelas de caseína e uma diminuição das forças de repulsão eletrostática, responsáveis inicialmente pela manutenção do estado coloidal, desestabilizando as micelas de caseína. Nesta fase, fatores físico-químicos como temperatura e pH bem como a concentração e o tipo de enzima, tem uma maior importância no processo de coagulação do leite (ALMEIDA, 2006).

A segunda e última fase do processo de coagulação do leite, designada de fase de agregação micelar, tem início quando cerca de 80 a 90 % da κ -caseína for acometida. Nesta fase ocorre a agregação das micelas de caseína desestabilizadas

e a formação de uma rede, inicialmente débil, que vai aprisionando os glóbulos de gordura, a água e os materiais hidrossolúveis.

Após esse momento, inicia-se um processo de agregação das partículas aumentando seu tamanho, observando uma reorganização das micelas agregadas e formando-se por fim, uma rede proteica designada de coalhada. Esta fase caracteriza-se por ser muito sensível a concentrações de íons Ca^{++} , à temperatura e ao pH .

Na fase final do processo de coagulação enzimática do leite, ocorre um fenômeno denominado sinérese, no qual ocorre uma expulsão espontânea do soro na sequência do aumento da rigidez do gel (ALMEIDA, 2006; ALVARENGA, 2008).

3.5.2 Tamanhos das micelas x coagulação do leite

O lucro das indústrias de laticínios depende dos fatores relacionados com a eficiência e rendimento no processo de transformação do leite em produtos lácteos principalmente o queijo. Da totalidade dos componentes principais do leite, a caseína é um dos que apresenta maior importância quando o leite é submetido a tratamentos térmicos, tais como , secagem e congelamento (GLANTZ *et al.*, 2010).

“As caseínas representam cerca de 80% da proteína total do leite. As micelas de caseínas são compostas por partículas coloidais imersas no leite, com formato arredondado e tamanho médio de 200 nm. Alguns estudos mostraram que o tamanho das micelas pode variar de acordo com a dieta dos animais, época do ano (menores no verão e maiores no inverno) e fatores genéticos. A quantidade de caseína e de proteínas do soro do leite também afeta o tamanho das micelas, enquanto as concentrações de cálcio e fosfato inorgânicos presentes no leite não afetaram o tamanho da micela. Para a fabricação de queijos há necessidade da coagulação do leite a partir da hidrólise da kappa-caseína por ações enzimáticas” (GLANTS *et al.*, 2010).

Estudos recentes mostraram que coágulos formados a partir do leite com micelas de caseína de tamanhos menores, apresentaram maior firmeza quando comparados com o coágulo formado a partir de micelas de caseína de tamanho maior e concluem que a seleção genética de vacas leiteiras para produção de leite com menor tamanho da micela de caseína e menor pH do leite pode melhorar as propriedades do leite na produção de queijos

3.6 Coagulantes (coalhos)

A dose de coalho ou coagulante varia de acordo com o fabricante, podendo ser usado na forma líquida ou em pó, desde que diluído em água não-clorada e adicionado lentamente ao leite sob agitação (FOX e MCSWEENEY, 1998; WALSTRA *et al.*, 1999; FOX *et al.*, 2000).

As enzimas coagulantes variam amplamente com respeito à atividade proteolítica, e algumas são tão ativas a ponto de não ser possível o seu aproveitamento para a produção de queijos duros. Geralmente, os coalhos microbianos apresentam maiores atividades proteolíticas que os coalhos de bezerros (LIMA *et al.*, 1996).

Alguns autores citam que, em decorrência da proteólise não específica em níveis elevados, pode ocorrer diminuição do rendimento do queijo, bem como alteração em suas propriedades reológicas e sensoriais. A diminuição do rendimento seria reflexo da perda de substâncias nitrogenadas e gordura para o soro. A maior taxa de proteólise seria responsável também pelo desenvolvimento de amargor durante a maturação, além de modificações indesejáveis na textura do queijo (USTUNOL & HICKS, 1990; EMMONS, 1990; LÓPEZ *et al.*, 1997).

Lima *et al.* (1996), ao estudarem o comportamento de diferentes coagulantes, observaram um aumento na atividade proteolítica em função do declínio do pH para o coalho microbiano de *R.miehei* e coalho de bezerro, não sendo observado o mesmo para o coalho genético, cuja atividade proteolítica manteve-se praticamente inalterada na faixa de pH estudada (5,6 a 6,8).

Ficou bastante evidente que, na faixa de pH de 5,7 a 6,2, a atividade proteolítica foi bem maior para o coalho microbiano, o que indicou que este coalho deve causar maior perda no rendimento em massa coagulada, em decorrência da proteólise não específica, nestes valores de pH. Em função desta maior taxa de proteólise para o coagulante microbiano em relação aos coalhos de bezerro, é possível que os queijos maturados, cujos valores de pH diminuem durante a maturação, apresentem também características sensoriais distintas, determinadas pelo tipo de enzima utilizada para a coagulação.

Segundo (PAULA *et al.*, 2009) “Com o aumento da produção mundial de queijos e a diminuição do suprimento de estômagos bovinos para produção comercial de coalho, várias pesquisas vêm sendo realizadas para o desenvolvimento e produção de um substituto adequado para coagular leite na produção de queijos. Muitas proteinases são capazes de coagular o leite, mas a maioria é muito proteolítica podendo provocar diminuição do rendimento da fabricação pela perda de peptídeos no soro além de sérios defeitos de sabor e textura nos queijos maturados, em consequência da proteólise excessiva e descontrolada.”

Em vista desta limitação, a coagulação do leite, etapa do processo em que a quimosina atua, tem sido alvo intenso de pesquisas que buscam novas fontes enzimáticas passíveis de substituí-la no processo. Também por motivos de legislação, biodiversidade, praticidade e custos, a principal fonte de prospecção é representada por proteases de microrganismos ou expressão heteróloga da quimosina nestes sistemas.

Contudo, as enzimas de microrganismos até hoje prospectadas não fizeram face às qualidades da quimosina e as quimosinas heterólogas trazem outro problema, pois é crescente o número pessoas que não consomem alimentos transgênicos (KUMAR *et al.*, 2006; KARIMI & ZAMANI, 2013; LEMES *et al.*, 2016).

3.7 Prospecção de enzimas coagulantes e seu uso na fabricação de queijos

Uma das principais enzimas utilizadas na coagulação do leite é a quimosina (E.C. 3.4.23.4), também denominada renina, sua obtenção é a partir do conteúdo do estômago de bezerros em lactação, essa enzima é utilizada pelo homem a décadas, sendo a produção de queijos como sua principal função.

É difícil adquirir a renina em quantidades suficientes para utilização industrial, por isso, outras fontes de enzima vêm sendo procuradas há muitos anos (ARIMA, 1970; GREEN, 1977).

Raposo e Domingos (2008) purificaram proteases aspárticas provenientes da planta *Centaurea calcitrapa* com ação na coagulação do leite.

Mazorra-Manzano e colaboradores (2013) avaliaram a ação na coagulação do leite de proteases presentes no extrato bruto de folhas cítricas, estas enzimas

foram capazes de coagular o leite em tempos semelhantes às enzimas utilizadas comercialmente.

A atividade proteolítica excessiva e a baixa atividade caseinolítica são indesejáveis para um substituinte da quimosina, pois coagulantes com alto nível de proteólise, podem gerar uma coalhada estruturalmente deficiente, acarretar em perdas de proteínas e gordura no soro, reduzir o rendimento e conferir sabor amargo ao produto final (JACOB; JAROS; ROHM, 2011).

A utilização de proteases de origem vegetal para o emprego na coagulação do leite tem despertado grande interesse, pela a facilidade de obtenção de extratos, fácil purificação e/ou isolamento de coagulante natural, além de agregar valor nutricional ao produto (KUMARI; SHARMA; JAGANNADHAM, 2012).

A busca por enzimas de origem vegetal estudadas quanto às suas propriedades coagulantes do leite, tem resultado em um mix de espécies dentre as quais: *Cucumis melo*, *Ficus religiosa*, *Ananas comosus*, *Lactuca sativa* e *Cynara cardunculus* (TABELA 2).

Embora muitas opções de enzimas estudadas não apresentem uma especificidade à caseína do leite, considerando tal especificidade fator importante na fabricação de queijos, os extratos da flor do cardo *C. cardunculus* é utilizado há séculos na fabricação de queijos artesanais principalmente em Portugal e Espanha (SOUZA-GALLAGHER; MALCATA, 1998).

Tabela 2 – Lista de enzimas de origem vegetal.

ESPÉCIE	ENZIMA	PARTE DA PLANTA	REFERÊNCIAS
<i>Oryza sativa</i>	Orizasina	Semente	Asakura <i>et al.</i> , 1997
<i>Cucumis melo</i>	Cucumisina	Fruto	Uchikoba, T., Kaneda, 1996
<i>Cynara cardunculus</i>	Cardosinas A e B	Flor	Heingartner <i>et al.</i> , 1990
<i>Euphorbia nivulia</i>	Nivulian I e II	Látex	Badgujar; Mahajan, 2014
<i>Helianthus annuus</i>	-	Semente	Egito <i>et al.</i> , 2007
<i>Ananas comusus</i>	-	Fruto	Cataneo <i>et al.</i> , 1994
<i>Bromelia hieronymi</i>	-	Fruto	Bruno <i>et al.</i> , 2010
<i>Ficus religiosa</i>	Religiosina B	Látex	Kumari; Sharma; Jagannadham, 2012

Fonte: Adaptado de Farias (2016).

Alguns trabalhos apontam características coagulantes do leite através de extratos de origem vegetal, como das flores de *Silybum marianum* (VAIRO-CAVALLI *et al.*, 2008), de *Onopordum acanthium* (BRUTTI *et al.*, 2012) e da *Moringa oleifera* (PONTUAL *et al.*, 2012)

Além das flores, frutos de *Solanum eleaeagnifolium* foram testadas quanto à sua capacidade de coagulação do leite na fabricação de queijos (NESTOR *et al.*, 2012), e das sementes de *Helianthus annuus* e *Albizia lebbbeck* (EGITO *et al.*, 2007).

Anusha, Singh e Bindhu, 2014, mostraram que o látex extraído das partes aéreas de *Calotropis gigantea*, formou coágulos firmes e um queijo de qualidade similar ao produzido a partir de enzima comercial a base de quimosina.

Folhas de *Urtica dioica* foram utilizadas como coagulante vegetal, com o objetivo de fornecer um coalho alternativo na fabricação de queijos (FIOL *et al.*, 2016).

Outras espécies vegetais também apresentaram padrão de hidrólise da κ -caseína semelhante ao coalho animal (Phe105 – Met106), como é o caso do extrato

de sementes de girassol (*H. annuus*) (EGITO *et al.*, 2007) e *O.sativa* (ASAKURA *et al.*, 1997).

Bruno *et al.*, (2010) relata que o queijo produzido a partir do extrato dos frutos de *Bromelia hieronymi* apresentou condições aceitáveis de aparência, textura e sabor.

Os queijos produzidos com o extrato de sementes de *Albizia julibrissin*, não desenvolveram amargura mesmo após três meses de maturação (OTANI; MATSUMORI; HOSONO, 1991). A clivagem da κ -caseína, α -caseína e β -caseína utilizando extratos de sementes de *Albizia julibrissin* e *Helianthus annuus* ocorreram de forma semelhante a quimosina (EGITO *et al.*, 2006).

Estudos de Freitas e colaboradores (2007), mostraram que proteases extraídas do látex de plantas laticíferas, da família *Apocynaceae* tem apresentado grande potencial biotecnológico, principalmente nos estudos de coagulação do leite.

Freitas e colaboradores, (2016), realizaram estudos relativos à atividade das enzimas do látex de *Calotropis procera* e *Cryptostegia grandiflora*, na coagulação do leite em comparação a quimosina de um coalho comercial. Os resultados apontaram que queijos produzidos com peptidases de *C. procera* e *C. grandiflora*, apresentaram rendimento superior de massa fresca quando comparados aos queijos em que se utilizou quimosina.

Segundo Leite (2016), o estudo de cinco frações laticíferas para coagulação do leite revelou que somente as peptidases de *C. procera* e *C. grandiflora* demonstraram potencial como alternativa para o uso da quimosina comercial animal.

Os queijos que foram obtidos com as peptidases de *C. procera* e *C. grandiflora* apresentaram aparentemente uma boa aparência, textura, aroma e sabor agradável (LEITE, 2016).

Enzimas coagulantes vegetais são essenciais para a manufatura e a maturação em queijarias, este tipo de coagulante tem como característica produzir queijos com textura suave, sabor levemente amargo e firmeza semidura (ROSEIRO, *et al*, 2003).

Ainda segundo Roseiro *et al*, 2003, queijos feitos com proteases vegetais são normalmente produzidos em escala artesanal, em uma fazenda ou pequeno laticínio, no entanto eles representam uma importante contribuição socioeconômica para a indústria de derivados do leite.

3.8 Proteases

Também denominadas peptidases, as proteases são enzimas proteolíticas que catalisam reações a partir da clivagem hidrolítica da ligação peptídica presentes em outras proteínas e polipeptídeos, resultando em peptídeos menores ou aminoácidos. (NEURATH, 1993).

Segundo Powers (2002) e Chou (2006), as proteases contabilizam cerca de 2% do genoma humano e estão envolvidas em muitos processos fisiológicos fundamentais, como por exemplo, a síntese das proteínas, liberação de hormônios precursores, translocação através de membranas, reaproveitamento de aminoácidos, digestão, sinalização celular, resposta imune e apoptose.

Em vegetais, proteases cisteínicas estão presentes em quase todos os tecidos e órgãos e possuem importantes papéis em processos intra e extracelulares, tais como o desenvolvimento e amadurecimento de frutos, degradação de proteínas de reserva, ativação de zimogênios, degradação de proteínas defeituosas, senescência, morte celular programada, reconhecimento de patógenos e indução de respostas de defesa (SCHALLER, 2004 ; VAN DER HOORN, 2008).

A classificação de proteases ocorre de acordo com o mecanismo de catálise, similaridade na sequência de aminoácidos e análise dos resíduos de aminoácidos posicionados em torno do sítio ativo da molécula. As proteases são classificadas de acordo com as classes (ou grupos), sendo as principais: serinoproteases, cisteinoproteases, aspárticoproteases e metaloproteases (POWERS, 2002; HEDSTROM, 2002).

3.8.1 Classificação das proteases

Em relação às enzimas proteolíticas, considera-se o termo peptidase como recomendado pelo Comitê Internacional de Nomenclatura Enzimática da União de Bioquímica e Biologia Molecular (NCI-UBMB), o termo refere-se a qualquer proteína que realiza hidrólise de ligação peptídica. Peptidases são normalmente conhecidas como proteinases, proteases ou enzimas proteolíticas (FEIJOO-SIOTA, 2011).

Um sistema complexo e eficiente de nomenclatura foi necessário devido à grande diversidade de proteinases existentes, principalmente quanto à grande variabilidade nas reações de catálise. Utiliza-se três critérios considerados na

classificação: mecanismo químico de catálise, natureza do sítio ativo e estrutura molecular e homologia de sequência (RAWLINGS *et al.*, 1993).

Segundo Hartley (1960), quatro são os mecanismos catalíticos distintos usados pelas proteases e suas observações iniciais foram desenvolvidas por Barret (1994) a partir da criação de um prático sistema de classificação para as proteases. Nesta classificação, as carboxipeptidases e as endopeptidases são divididas em subclasses, tendo como base o seu mecanismo catalítico.

As Enzimas proteolíticas ou proteases são enzimas da classe 3 as hidrolases, e subclasse 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases. Estas enzimas constituem uma grande família (EC 3.4), dividida em endopeptidases ou proteinases (EC 3.4. 21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia.

Endopeptidases podem ser ainda subdivididas em serina (EC 3.4.21), cisteína (EC 3.4.22), aspártico-proteinases ou endopeptidases (EC 3.4.23) e metaloproteinases ou metaloendopeptidases (EC 3.4.24) de acordo com o grupo reativo no sítio ativo envolvido com a catálise. As enzimas cujo mecanismo de ação não está completamente elucidado são classificadas no subgrupo EC. 3.4.99.

A classificação mais atual das enzimas, encontrada na base de dados MEROPS é hierárquica, fundamentada na estrutura das proteases. Nesta, cada protease é atribuída a uma família com base em semelhanças estatisticamente significativas na sequência de aminoácidos, e as famílias homólogas são agrupadas em conjuntos que são denominados “clãs” (RAWLINGS *et al.*, 2003) (TABELA 3).

Tabela 3 – Características das principais classes de proteases.

Tipo de Protease	Aminoácido do sítio ativo	pH ótimo	Exemplos
Serínica	Serina e histidina	7-9	Tripsina, Quimotripsina e Trombina
Cisteínica	Cisteína e histidina	4-7	Papaína, Ficina e Bromelaína
Aspártica	Aspartato e tirosina	<5	Pepsina e Renina
Metaloprotease	Íon metálico (Zn ²⁺ , Ca ²⁺ ou Mn ²⁺)	7-9	Carboxipeptidases A e B e Aminopeptidases

Fonte: Adaptado de FREITAS (2009).

3.8.1.1 Proteases cisteínicas

Nos vegetais, proteases cisteínicas especialmente as enzimas das plantas tropicais *Carica papaya* (papaína, quimopapaína, caricaína, glicilendopeptidase); *Ananas comosus* (bromelaína, ananaína, comosaína), e *Ficus glabrata* (ficina) são de importância comercial considerável, devido à sua forte atividade proteolítica sobre uma variedade de substratos proteicos e estabilidade em uma larga faixa de pH e temperatura (FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2011).

De acordo com o banco de dados MEROPS, as famílias das proteases cisteínicas estão atualmente distribuídas em 10 clãs assim denominados: CA, CD, CE, CF, CH, CL, CM, CN, CO, e C. Até a presente data, as proteases cisteínicas de plantas foram descritas como pertencentes a cinco destes clãs (CA, CD, CE, CF e CO) (RAWLINGS *et al.*, 2010).

3.8.2 Fontes de obtenção

Considerando que as proteases são fisiologicamente necessárias à sobrevivência de todos os seres vivos (RAO *et al.*, 1998), elas podem ser obtidas de diferentes fontes, como plantas, animais e microrganismos. Embora as proteases microbianas sejam geralmente produzidas por cultivo submerso, processos de cultivo

em estado sólido, também têm sido utilizados em um menor grau para a produção dessas enzimas (GEORGE *et al.*, 1995).

A utilização de plantas como produtoras de proteases é regida por vários fatores, como a disponibilidade de terra para o cultivo, adequação do clima as condições necessárias para o crescimento da planta e a produção da enzima. Como exemplo, de proteases de origem vegetal, pode-se citar a papaína, a bromelina e algumas queratinases. (RAO *et al.*, 1998).

Segundo RAO e colaboradores (1998), as proteases de origem animal são produzidas em grande quantidade e de forma bastante pura, porém sua produção depende do abate de animais, o que envolve questões políticas e éticas, dificultando assim sua obtenção. As principais proteases produzidas por animais são a quimosina, tripsina pancreática, quimotripsina, pepsina e renina.

“A estabilidade enzimática também é um parâmetro importante para determinar a viabilidade econômica dos processos industriais, pois uma alta estabilidade é uma vantagem econômica devido à diminuição de gastos com a enzima. Por isso, antes de começar a desenvolver uma formulação envolvendo proteases é necessário acumular informações sobre a estabilidade da enzima em diferentes condições” (GOHEL, 2012; VIEILLE, 2001).

3.8.3 Enzimas certificadas para uso na indústria alimentícia

Segundo a Anvisa na RDC 54/2014 caracteriza preparação enzimática como sendo “Formulação constituída por uma ou mais enzimas, com a incorporação de ingredientes ou aditivos alimentares, a fim de facilitar o seu armazenamento, comercialização, padronização, diluição ou dissolução” dessa forma as proteínas do látex (PL) de *Calotropis procera*, pode ser caracterizado como uma PREPARAÇÃO ENZIMÁTICA classificada ainda na RDC 53/2014 como sendo do grupo das COAGULASES VEGETAIS devido à sua fonte vegetal de obtenção.

A lista de enzimas com uso na indústria de alimentos pode ser consultada através da RDC 53/2014 e ainda que qualquer enzima não conste na mesma, deve-se solicitar a inclusão através de um relatório técnico a respeito da enzima que se pretende incluir, respeitando as classificações propostas pela regulamentação supra (TABELA 4).

Tabela 4 – Lista de enzimas utilizadas na indústria de alimentos e respectivas fontes de obtenção.

Enzimas de Origem Animal	
NOME DA ENZIMA OU COMPLEXO	FONTE DE OBTENÇÃO
Alfa-amilase	Pâncreas suíno ou Bovino
Quimosina	Abomasso de Bezerro ou Caprino
Lactoperoxidase	Leite Bovino
Enzimas de Origem Vegetal	
NOME DA ENZIMA OU COMPLEXO	FONTE DE OBTENÇÃO
Bromelina	Caule, folhas e frutos da família Bromeliaceae (<i>Ananass atívus</i> e <i>Ananas comosus</i>)
Coagulase Vegetal	Cardo <i>Cynara cardunculus</i> Figo <i>Ficus carica</i>
Papaína	Caule, folhas e frutos de plantas da família Carica (<i>Carica papaya</i> e <i>Ananas bracteatus</i>)
Enzimas de Origem Microbiana	
NOME DA ENZIMA OU COMPLEXO	FONTE DE OBTENÇÃO
Alfa-acetolactato de carboxilase	<i>Bacillus brevis</i> expresso em <i>Bacillus subtilis</i>
Protease	<i>Aspergillus melleus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Quimosina	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i> <i>Escherichia coli</i> K-12 contendo gene de Proquimosina A <i>Kluyveromyces lactis</i> contendo gene de Proquimosina B

Fonte: Adaptado da RDC 53/2014 que dispõe sobre a lista de enzimas, aditivos alimentares e veículos autorizados em preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral.

A inclusão de uma nova enzima ou preparação enzimática no rol de enzimas certificadas e permitidas pela ANVISA, deve ser mediante solicitação por meio de detalhado relatório técnico, constando características bioquímicas, qualidade e segurança da enzima quando utilizada na indústria de alimentos, através de testes de citotoxicidade e alergenicidade.

O apelo biotecnológico na busca de enzimas e coagulantes, que possam incrementar o mercado dos queijos de origem vegetal, tem crescido nos últimos anos devido em parte à procura por produtos vegetarianos, veganos e lactovegetarianos, principalmente ao mercado de queijos denominados especiais.

Enzimas de origem vegetal utilizadas como coagulantes, são extraídas de diversas partes da planta como frutos, sementes, folhas, flores e em alguns casos de um fluido denominado látex, específico de algumas plantas.

3.9 Látex

Látex é uma emulsão viscosa, de aspecto leitoso, exsudada de coníferas (*Gnetum* spp.), fungos (*Lactarius* spp.) e algumas famílias de plantas da classe *Angiospermae*, como *Euphorbiaceae*. O termo látex é amplamente usado para descrever um líquido de aspecto leitoso, presente em aproximadamente 20.000 espécies de plantas de 40 famílias (DOMSALLA & MELZIG, 2008).

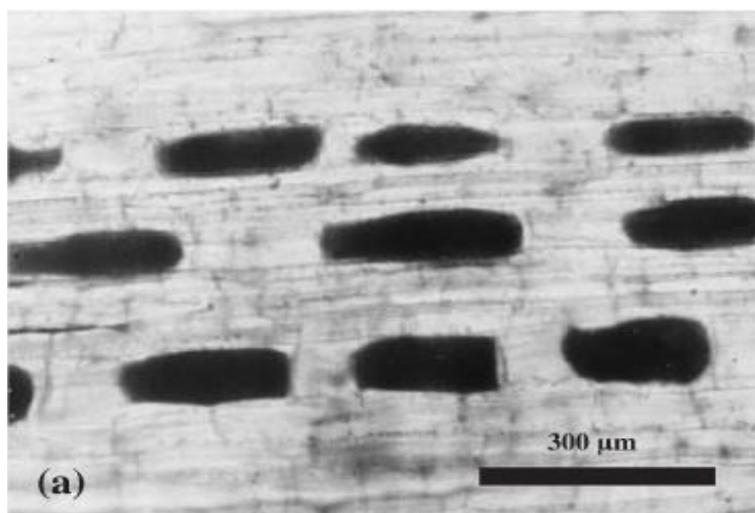
Devido sua capacidade coagulante quando exposto ao ar, o látex é capaz de selar áreas afetadas na planta, protegendo-a contra o ataque de insetos e patógenos. Possuem, em sua composição, água, proteínas, metabólitos secundários, carboidratos, lipídios, vitaminas, além de componentes celulares (AGRAWAL; KONNO, 2009).

Denomina-se canais laticíferos a sistemas de canais que são formados por um conjunto de células tubulares alongadas altamente especializadas. É neste local que o látex é produzido e armazenado, podendo estar presente em todas as partes da planta ou isolado em tecidos e órgãos como em raízes, caules, pecíolos e folhas. (PICKARD, 2008) (FIGURA 7).

Quando os vegetais sofrem algum tipo de injúria física, o látex é liberado, e aglutina progressivamente. Devido a essa e outras observações, o látex tem sido amplamente relacionado com a defesa vegetal (FARREL, *et al.*, 1991; BERNAYS & CHAPMAN, 1994, HAGEL, *et al.*, 2008) (FIGURA 8)

O látex também pode ter uma ação colante immobilizando pequenos insetos ou mesmo uma lagarta (DUSSOURD, 1995). Entretanto, além deste efeito mecânico, a composição química do látex parece ser também objeto de defesa, neste caso agindo quimicamente no combate a fungos e insetos (GIORDANI, *et al.*, 1999; RAMOS, *et al.*, 2007).

Figura 7 - Canais laticíferos não anastomosados de uma haste de Moonflower (*Ipomoeae alba* L.)



Seção longitudinal de uma haste de moonflower (*Ipomoea lba* L.) visto na luz branca transmitida. (a) Vários canais laticíferos não anastomosados; as regiões escuras são concentrações intracelulares de látex.

Fonte: Pickard (2008).

Segundo Araújo (2013), Os canais laticíferos podem estar presentes em todas as partes da planta ou apenas em tecidos ou órgãos restritos.

Dessa forma, o fluido pode ser extraído a partir de seus frutos (*Carica papaya*), folhas, caules e frutos (*Calotropis procera*), galhos (*Plumeria rubra*, *Cryptostegia grandiflora*) ou troncos (*Himathantus drasticus*).

Figura 8 – Exsudação e coleta do látex de *Calotropis procera*.



Fonte: Próprio autor

3.9.1 Composição Química do látex

O látex apresenta elevada concentração de poli-isopreno (borracha), sendo encontrado em diferentes concentrações nas seguintes espécies: *H. brasiliensis* (*Euphorbiaceae*) 44,3%, *Ficus spp.* (*Moraceae*) 15-30%, *Parthenium argentatum* (*Asteraceae*) 8%, *Calotropis procera* (*Apocynaceae*) 82,52%, *Cryptostegia grandiflora* (*Apocynaceae*) 96,6% e *Plumeria rubra* (*Apocynaceae*) 82,2% (AGRAWAL; KONNO, 2009; KONNO, 2011; FREITAS *et al.*, 2007,2011).

Bioquimicamente, o látex é o conteúdo citoplasmático das células laticíferas, sendo caracterizado como uma suspensão rica em partículas de hidrocarbonetos, do grupo dos terpenos, em uma matriz aquosa. Mas, muitas outras substâncias são encontradas no látex, como: açúcares, alcalóides, proteínas, ceras, amido, polifenóis, terpenos e taninos (YEANG *et al.*, 2002). Em látex também são encontrados, carbonatos, vitaminas, lipídios e aminoácidos, além de componentes celulares (MORCELE *et al.*, 2004; HAGEL *et al.*, 2008; JOHN *et al.*, 2003).

3.10 Plantas laticíferas

Certas espécies de plantas quando sofrem algum tipo de dano mecânico ou herbivoria, liberam um líquido de aspecto leitoso, que exsuda principalmente das

partes aéreas, (KEKWICK, 2001).

Esse látex geralmente apresenta coloração branca nos gêneros *Apocynaceae* e *Urticaceae* mas pode ser encontrado nos tons vermelho intenso a vermelho claro como nas espécies do gênero *Euphorbiaceae* (JUCÁ *et al.*, 2018).

3.10.1 Família Apocynaceae

As plantas do gênero *Apocynaceae* Juss., incluindo *Asclepiadoideae* e *Periplocoideae*, são reconhecidas pela presença de canais laticíferos, formação de uma região expandida na porção apical dos estiletos, produção de viscosidade no gineceu, ovário apocárpico e folículos na maioria dos gêneros (JUDD *et al.*, 1994; NICHOLAS & BAIJNATH, 1994; STRUWE *et al.*, 1994).

A família *Apocynaceae* está entre as que apresentam maior número de espécies do mundo vegetal, com uma diversificação notável de plantas, desde as menores herbáceas, passando por subarbustos, arbustos, lianas, até árvores, com a maioria delas apresentando tecido lactescente.

Representada em todos os continentes (exceto Antártica), em regiões tropicais e temperadas, desde o nível do mar até as montanhas mais altas, preferindo solos secos, com mais de 400 gêneros e cerca de 4.500 espécies; no Brasil são aproximadamente 850 espécies dentro de 90 gêneros.

Espécies dessa família estão distribuídas ao longo dos trópicos, muitas delas são encontradas no Brasil e caracterizam-se por serem produtoras de alcalóides tóxicos e/ou medicinais (MABBERLEY, 1997). Um grande número de plantas dessa família é utilizado na medicina popular e também em rituais religiosos e de magia desde os tempos remotos (MEDEIROS, 2003).

Atualmente, a medicina moderna emprega substâncias extraídas dessa família para vários tipos de tratamento, como, por exemplo, na quimioterapia neoplásica, que emprega a Vimblastina e a Vincristina, alcalóides indólicos monoterpênicos extraídos do *Cantharanthus roseus*; e também em drogas antidepressivas e tranqüilizantes, como a Reserpin extraído de *Rauvolfia serpentina* (SCHMELLER e WINK, 1998).

Uma biomembrana obtida a partir do látex de *Calotropis procera*, tem sido utilizada na cicatrização de úlceras plantares, como tratamento inovador na redução do tempo de cicatrização, desbridamento do tecido desvitalizado e aumento de tecido epitelizado (NUNES, 2017).

3.10.1.1 *Calotropis procera*

É uma planta laticífera pertencente à família *Apocynaceae*, subfamília *Asclepiadoideae* (TABELA 5). Seu nome científico é originário do grego (“Kalos” = belo, “tropis” = barco) e do latim (“procerus” = alto, esbelto) (KISSMANN e GROTH, 1999).

Tabela 5 - Classificação taxonômica da planta *Calotropis procera*.

Reino Plantae
Subreino Tracheobionta
Divisão Magnoliophyta
Classe Magnoliopsida
Subclasse Asteridae
Ordem Gentiales
Família Apocynaceae
Subfamília Asclepiadoideae
Gênero <i>Calotropis</i>
Espécie <i>Calotropis procera</i> (Ait.)

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=141467>, acesso em 12 de dezembro de 2018.

Trata-se de um arbusto, perene, com pouca ramificação e que pode alcançar até 3,5 m de altura. Suas folhas são grandes, subcoriáceas; seus frutos são cápsulas infladas, globosas, grandes, com sementes cobertas por painas brancas sedosas; suas flores são de cor roxa, dispostas em inflorescências fasciculadas terminais. A sua disseminação se dá pelo vento (KISSMANN e GROTH, 1999; LORENZI e MATOS, 2002).

No Brasil em meados do século XIX, foi introduzida como planta ornamental e após sua introdução no país, passou a se comportar como invasora de áreas de pastagem, atualmente é encontrada em diversos tipos de ecossistemas, tem preferência por solos arenosos e degradados, sendo altamente resistente à seca e facilmente encontrada em margens de estrada, terrenos abandonados e dunas (LORENZI e MATOS, 2002) (FIGURA 9).

Esta espécie possui muitos nomes populares, que variam de acordo com a região em que é encontrada: Algodão-de-seda e Seda (PE), Flor-de-seda, Ciúme e Hortêncina (CE), Paninha-de-seda (SP), Leiteiro (SP, MG), Queimadura e Jacaúna (NE) (SILVA *et al.*, 2010).

Segundo Kissmann e Groth (1992), *C. procera* pode ser encontrada atualmente em diversas regiões do país, mas é no Nordeste que estão estabelecidas as grandes populações da espécie (FABRICANTE, 2013).

Figura 9 – Planta *Calotropis procera*.



Legenda: (A), (B) e (C) Diferentes ambientes onde se encontra *C. procera*. (D) Detalhe do fruto de *C. procera*.

Fonte: Próprio autor.

A espécie é natural de regiões áridas e semiáridas da Ásia e África (LINDLEY, 1985; RAHMAN & WILCOCK, 1991; CHAUDHARY & AL-JOWAID, 1999). Desenvolve-se em solos de baixa fertilidade, arenosos e ácidos (SHARMA, 1934; FERREIRA, 1973; FERREIRA & GOMES, 1974).

A tolerância a esta combinação de condições edafoclimáticas, certamente faz com que a espécie obtenha sucesso nos ambientes elencados (Savana, Savana Estépica e Formações Pioneiras). Associado a seus atributos, a falta de inimigos

naturais na região (LEAL *et al.*, 2010) e a degradação antrópica dessas formações vegetacionais, acabam sendo grandes facilitadores para a expansão da área de ocorrência de *C. procera*, uma vez que a mesma suporta sítios modificados antropogenicamente (SOUTO *et al.*, 2008).

Segundo Fabricante (2013), conforme a distribuição dos limites de tolerância da espécie à precipitação e a temperatura constatou-se que *C. procera* é eurihídrica e estenotérmica.

4 MATERIAIS

4.1 Reagentes

Azocaseína, L-cisteína, ácido tricloro-acético (TCA), persulfato de amônio, *coomassie brilliant blue* G-250, ácido fosfórico 2%, dodecil sulfato de sódio (SDS), marcadores de massa molecular, betamercaptoetanol, N,N,N',N' tetrametiletilenodiamino (TEMED), albumina Sérica Bovina (BSA), acrilamida, bisacrilamida, tween 20, membranas de diálise *cut off* 14 kDa, obtidos de Sigma ou Sigma- Aldrich Co., USA. Anticorpos primários anti-protease e anti-LP, IgG de cabra anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina, p-nitrofenil fosfatodissódico obtido da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Os demais reagentes foram de grau analítico e de diferentes fornecedores. Coalhos comerciais, Coalhopar® a base de quimosina animal e Halamix® a partir de quimosina microbiana, obtidos no mercado local de Fortaleza, CE.

4.2 Equipamentos

Espectrofotômetro Genesys 10 S UV-Vis, FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) Akta Pure GE Healthcare Life Sciences centrífuga HIMAC-HITACH CR22 GIII, liofilizador Christ ALPHA 1-2 LD plus, Conjunto eletroforese vertical MiniVE GE Healthcare, Coluna de troca catiônica Resource-S 6 ml GE Helthcare, banho-Maria BM-02, chapa aquecedora Fisatom, balança analítica Marte AY220, sonicador ALPHA 3L Plus, PHmetro Kasvi, agitador magnético CIMAREC-2, Microcentrífuga Novatécnica NT805.

4.3 Material Vegetal

A planta *Calotropis procera* (Ait.) R.Br., pertencente à família Apocynaceae, foi identificada pelo Professor Edson de Paula Nunes, taxonomista do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará e foi depositada sob exsicata de número 32663.

4.4 Coalho de Origem Vegetal

Material processado a partir do látex de *Calotropis procera*, bioquimicamente denominado proteínas do látex (PL) e nessa pesquisa, intitulado de coalho de origem vegetal ou coalho vegetariano.

5 COLETA, PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS DO LÁTEX (PL) UTILIZADAS COMO COALHO DE ORIGEM VEGETAL

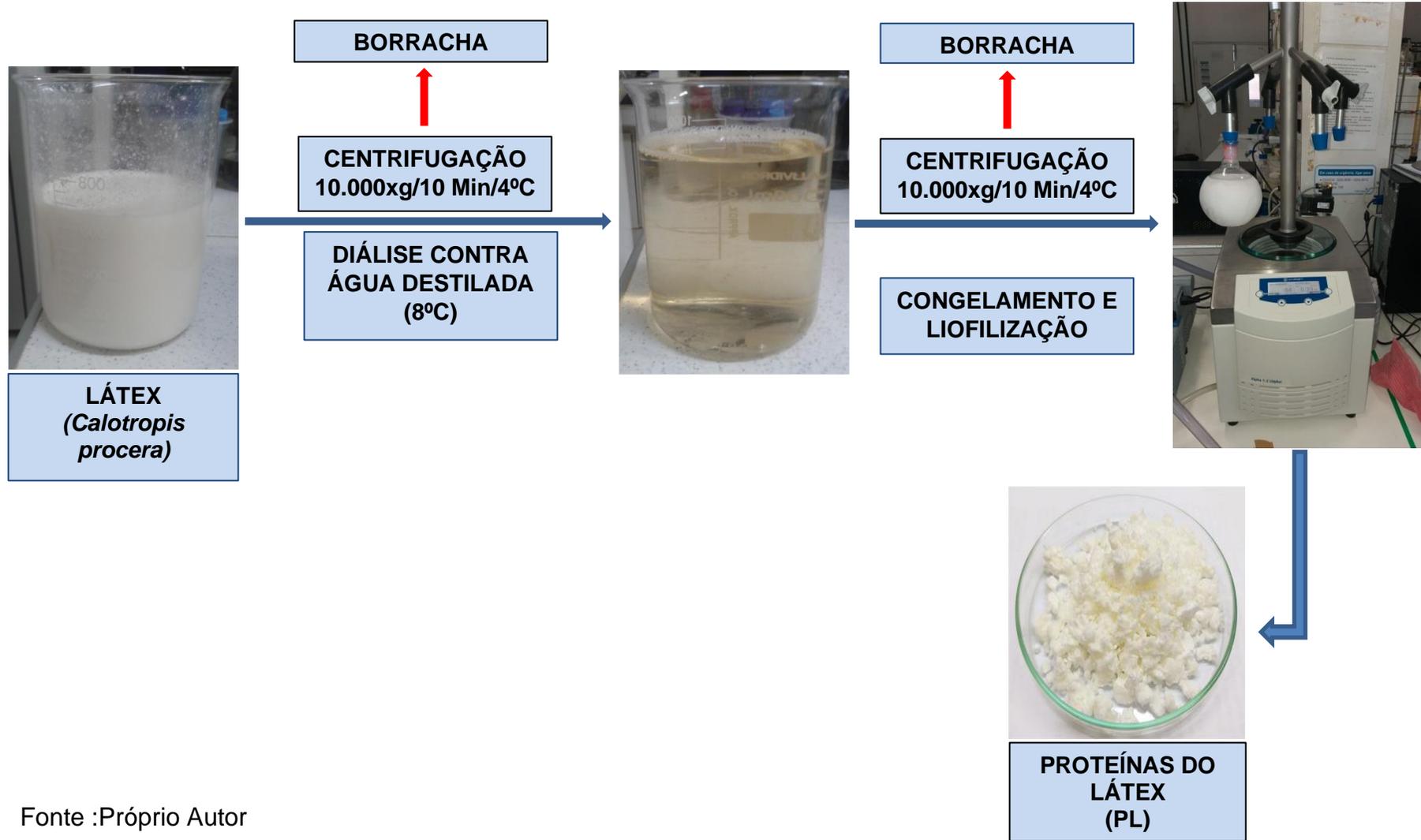
5.1 Metodologia

5.1.1 Coleta e processamento do látex

O látex de *Calotropis procera* foi sempre coletado no período da manhã, a partir das 07:00 horas não excedendo as 09:00, pois nas primeiras horas do dia, verifica-se uma maior disponibilidade do fluido laticífero. A exsudação ocorre após injúria apical na planta, o látex é coletado em tubos Falcon de 40 ml com água destilada na proporção de 1:1 (v/v). A coleta de até 20 mL de látex puro pode ser obtida de um único exemplar da planta e leva em média 10-15 min. (RAMOS *et al.*, 2010). Todo o processo de coleta, aconteceu com o material mantido sob refrigeração em caixas térmicas.

Após coleta, o látex de *C. procera*, foi levado ao Laboratório de Plantas Laticíferas da UFC para que fosse realizado o processamento e separação das frações isoprenóides e metabólitos secundários, da fração proteica.

Uma primeira centrifugação foi realizada nas condições de 10.000 x g a 4°C por 10 minutos, nessa etapa uma maior parte de isoprenos (borracha) é separada do sobrenadante. O sobrenadante é transferido para membranas com poros de 14 KDa submetido à diálise contra água destilada por 3 dias, com trocas em ciclos de 8 horas, as diálises foram realizadas em refrigerador com temperatura controlada de 8°C. Nova centrifugação nas mesmas condições anteriores, elimina traços de isoprenos na suspensão (ALENCAR *et al.*, 2006). Toda fração borracha obtida é eliminada no processo. A suspensão é congelada e liofilizada obtendo assim as proteínas do Látex (LP) (FIGURA 10).

Figura 10 – Processamento do Látex de *Calotropis procera*

Fonte :Próprio Autor

5.1.2 Caracterização Bioquímica

A caracterização das proteínas do látex (PL) nesse trabalho, busca o controle de qualidade quanto a sua estabilidade no armazenamento (teste de prateleira) e otimização nas coletas a partir de possíveis variabilidades sazonal e temporal.

5.1.2.1 Avaliação da Estabilidade do Coalho Vegetariano - Teste de Prateleira.

A estabilidade das proteases presentes no coalho vegetariano foi avaliada a partir do delineamento de um protocolo experimental. Em linhas gerais, os protocolos objetivaram analisar a estabilidade, frente a possíveis alterações físico-químicas e bioquímicas, quando armazenado por 12 meses, em condições de temperatura e luminosidade controladas, e análises com periodicidade mensal (T1 a T12). Neste trabalho considerou-se um lote, 300 mg de coalho de origem vegetal acondicionado em frasco de Polietileno Tereftalato (PET) opaco e capaz de conservar ao abrigo da luz.

Solubilidade

Ao longo de doze meses, para cada uma das amostras mensalmente analisadas, observou-se antes da reconstituição em água, o aspecto físico referente a possíveis alterações na coloração e na integridade das proteínas do látex (PL), presentes no coalho de origem vegetal.

O estudo de uma possível instabilidade no armazenamento do coalho de origem vegetal em relação à solubilidade em água, foi verificado a partir de uma concentração inicial de 1mg/mL, centrifugada nas condições 10.000 x g/10 minutos a 4° C, diluições prévias foram necessárias antes das leituras em espectrofotômetro a 280 nm. As diluições foram necessárias para que se padronizasse leituras em torno de 400 nm, obtida através da solução 1:2 (m/v). A cada intervalo de 30 dias, 20 mg de amostra eram transferidos e reconstituídos em água para que se estudasse possíveis variações de solubilidade ao longo de 12 meses.

Atividade Proteolítica

O estudo de possíveis variações nas características bioquímicas das proteínas do látex (PL) constituintes do coalho vegetariano, a partir de um lote mantido sob condições de armazenagem (temperatura ambiente e ao abrigo da luz), foi submetido a ensaios mensais por 12 meses, visando estudar variações bioquímicas das proteínas do coalho vegetariano. A concentração inicial testada foi de 1mg/ml, na qual foi testada a atividade proteolítica, utilizando azocaseína 1% (p/v) como substrato (XAVIER-FILHO *et al*, 1989).

Alíquotas de 50 μ L em triplicata, a partir da solução 1mg/mL de coalho de origem vegetal receberam 40 μ L de L-cisteína, que funciona como um agente redutor capaz de ativar as proteinases do tipo cisteínicas, em seguida adicionou-se quantidade de água destilada necessária para um volume final de 300 μ L em cada alíquota. Após 10 minutos da adição da L-cisteína, adicionou-se 200 μ L do substrato inespecífico azocaseína (1%) em todas as amostras, que foram em seguida incubadas a 38°C por 1 hora. Após o período de incubação, a reação foi parada com 300 μ L de ácido tricloroacético 12% centrifugadas a 10.000 x g/10 min a 4°C, 400 μ L do sobrenadante foi alcalinizado com 400 μ L de NaOH 2M e em seguida realizadas leituras em espectrofotômetro a 420 nm. Aos brancos da reação, a azocaseína 1% (p/v) (substrato) foi adicionada somente após interrupção da reação com TCA 20% (v/v). Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorbância em 0,01. O ensaio do lote foi realizado por 12 meses com periodicidade mensal.

Dosagem de Proteínas

O teor de proteínas presentes do coalho de origem vegetal, foi estimado pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976). A partir de 50 μ L da amostra diluída na proporção 1:1, adicionou-se 2,5 mL do reagente de Bradford, a solução foi levemente agitada e após 10 min, foram realizadas as leituras das absorbâncias a 595 nm em espectrofotômetro. (Ultrospec 1000 Amersham Pharmacia) com absorbância no comprimento de onda de 595 nm. Albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada para obtenção de uma curva padrão do reagente de Bradford.

A quantidade de proteínas foi estimada utilizando-se Albumina Sérica Bovina (BSA) como referência padrão para a curva de calibração.

Atividade Proteolítica Específica

De posse das absorvâncias obtidas na atividade proteolítica e dosagem de proteínas, calculou-se a atividade específica do coalho de origem vegetal, como sendo a relação entre unidade de atividade proteolítica (UA) e a quantificação de proteínas em μg .

*5.1.2.2 Variabilidade sazonal e temporal nas coletas do látex de *Calotropis procera*.*

O desenvolvimento desse ensaio busca verificar padrões presentes nas proteínas do látex de *Calotropis procera*, que possam otimizar os melhores locais e melhores estações (seca e chuvosa) em que as coletas possam ser realizadas, obtendo assim uma maior produtividade e efetividade de PL no uso como coalho de origem vegetal.

Segundo Lima (2002), Verifica-se mudanças em plantas laticíferas, em relação à fatores ambientais, durante as diferentes estações quando ocorrem variações de luz, temperatura, umidade do ar e disponibilidade de água no solo.

Essas variações afetam as trocas gasosas e o metabolismo de carboidratos e conseqüentemente, influenciam a produção de Látex ao longo do ano. (LIMA, 2002)

Dessa forma estudar as variações climáticas que uma planta laticífera possa estar submetida e suas interações, com diferentes tipos de solos, salinidade e disponibilidade de nutrientes podem indicar maior ou menor produção e qualidade de seus fluidos laticíferos.

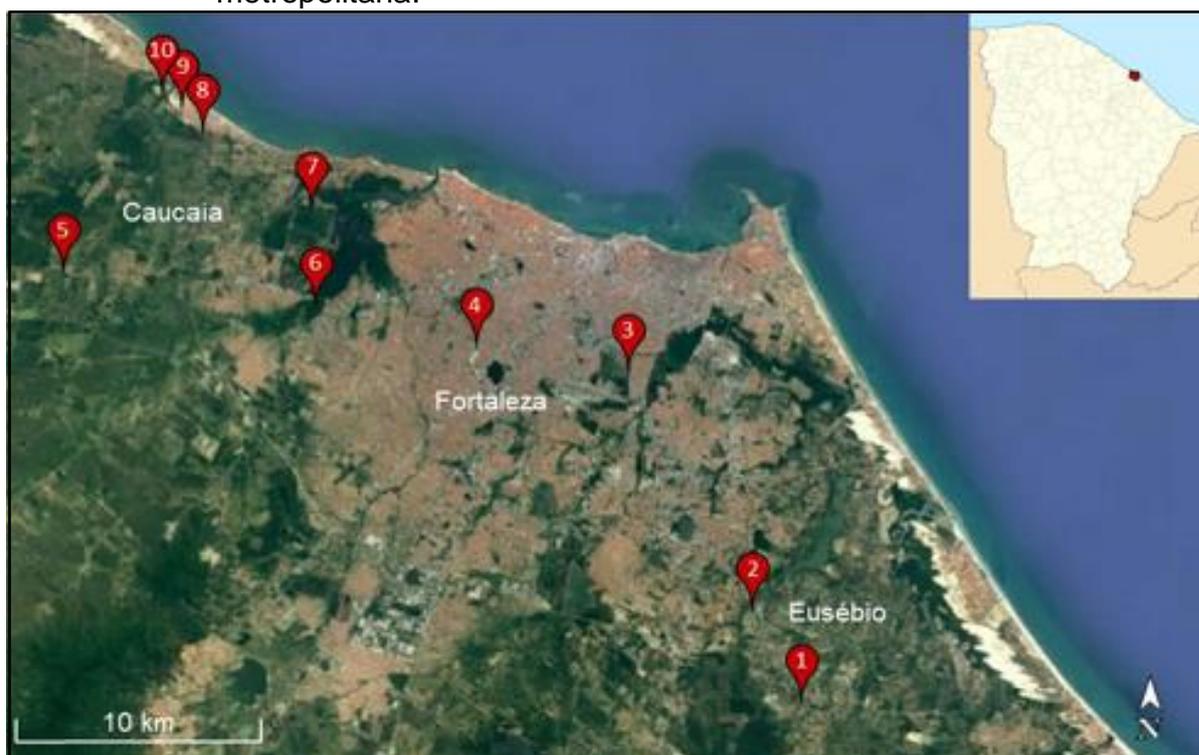
Foram georreferenciados 10 pontos de coleta ao longo de Fortaleza e regiões metropolitanas de Caucaia e Eusébio, levando em consideração diferentes ambientes geomorfológicos e de ação antrópica (TABELA 6 e FIGURA 11).

Tabela 6– Pontos de coleta.

Pontos de Coleta		Coordenadas*	
P1	Cidade do Eusébio	3°53'09" S	38°27'27" W
P2	Rio Coaçu	3°51'17" S	38°28'20" W
P3	BR116	3°45'00"S	38°31'06" W
P4	Campus do Pici	3°45'11"S	38°34'28" W
P5	Lagoa do Genipabu	3°43'46"S	38°43'22" W
P6	Rio Ceará	3°44'27" S	38°37'52"W
P7	Mangue de Iparana	3°42'50" S	38°37'58" W
P8	Praia do Icaraí	3°40'16"S	38°40'67" W
P9	Dunas do Icaraí	3°39'54"S	38°40'38" W
P10	Praia do Cumbuco	3°39'30"S	38°41'12" W

*UTM (Universal Transversa de Mercator)

Figura 11 – Mapa dos pontos de coleta georreferenciados em Fortaleza e região metropolitana.



Fonte: Google Earth (2019)

Dessa forma, os pontos de coleta foram classificados em zonas de coleta onde cada zona apresenta situações razoavelmente semelhantes de solo, geomorfologia e gradiente de salinidade. Denominou-se de urbana a zona que compreende os pontos P1, P3 e P4, águas interiores (rios e lagoas) P2, P5 e P6 e faixa de praia e campos de dunas os pontos P7, P8, P9 e P10 (TABELA 7).

Tabela 7 – Pontos e zonas de coleta.

Pontos de Coleta	Zonas de Coleta
P1, P3, P4	Urbana
P2, P5, P6	Águas interiores
P7, P8, P9, P10	Faixa de Praia e Campo de Dunas

Fonte: Próprio autor

As coletas aconteceram ao longo do ano de 2017 respeitando a sazonalidade climática da região, onde se evidencia dois períodos bem distintos, no primeiro semestre um período denominado chuvoso e o segundo semestre, o período seco ou de estiagem.

O máximo precipitado no norte do Nordeste, principalmente no estado do Ceará, oeste do Rio Grande do Norte, e no interior da Paraíba e de Pernambuco, ocorre no período de 26 fevereiro a maio, devido ao deslocamento da Zona de Convergência Intertropical (ZCIT). (ARAÚJO, 2013)

As datas das coletas foram de acordo com as estações do ano, pois mesmo com duas estações bem definidas no Nordeste, na natureza as plantas são regidas por ciclos de acordo com as 4 estações (TABELA 8).

Tabela 8 – Calendário de coletas.

Coletas	Períodos das coletas	Estações*
1	06 e 08/03/2017	Verão
2	05 e 07/06/2017	Outono
3	04 e 06/09/2017	Inverno
4	04 e 06/12/2018	Primavera

*Período das estações referentes ao ano de 2017.

Em cada ponto foram coletados, utilizando tubos Falcon, 80 ml da solução de látex 1:1 em água destilada, mantidos em caixa térmica até seu processamento, no laboratório de plantas laticíferas, departamento de bioquímica e biologia molecular da Universidade Federal do Ceará. As amostras foram inicialmente centrifugadas a

10.000 x g por 10 minutos a 4°C para a separação da fração isoprenóide (borracha) do látex, o sobrenadante foi então transferido a membranas de 14 KDa, para início das diálises contra água destilada sob temperatura controlada de 8°C, com trocas sucessivas em ciclos de 6 horas no total de 9 trocas de água. Após esse processo realizou-se uma nova centrifugação nas mesmas condições anteriores, eliminando frações de borracha ainda presentes, a solução foi então congelada e liofilizada, obtendo então as proteínas do látex (PL).

Os ensaios realizados com o PL foram atividade proteolítica, eletroforese e cromatografia.

Atividade proteolítica

A cada coleta realizada em 10 pontos distintos testou-se em cada ponto, a partir de uma concentração de 1mg/ml da solução do coalho vegetariano, a atividade proteolítica total seguiu mesmo protocolo anterior.

Atividade Específica (UA/ μ gP)

Seguindo mesma metodologia anterior, calculou-se a atividade proteolítica específica para os 10 pontos de coleta estudados, em estações do ano distintas, variando entre período chuvoso e seco.

Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Objetivando verificar uma padronização no perfil das proteínas do coalho vegetariano, coletado em 10 regiões distintas (P1 a P10), foi examinado por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) e β -mercaptoetanol segundo o método de Laemmli (1970), adaptado para o uso de géis de separação em placas. O processo foi conduzido em gel vertical. Os géis foram montados com dimensões de 8,0 x 7,5 x 0,1 cm. O gel de aplicação foi preparado de forma a conter 5 % de acrilamida e 10 % de SDS em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8. O gel de separação, contendo 12,5 % de acrilamida e 1 % de SDS, foi montado em tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8.

As amostras de 3 mg de coalho de origem vegetal, referentes aos pontos de coleta estudados, foram dissolvidas em 800 μ l de água destilada + 200 μ l de tampão de amostra 5x concentrado (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo 0,1 % de SDS e 5 % de β -mercaptoetanol e traços de azul de bromofenol 0,02% para marcação

da frente de corrida eletroforética.) em condições desnaturantes, em seguida tratadas por 5 min, a 100 °C. Depois de resfriadas, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, por 5 min, a 4 °C. 10µl do sobrenadante para cada ponto de coleta, foi aplicado em cada poço.

Para a estimativa da massa molecular das proteínas em análise, foram utilizados os seguintes marcadores de massa molecular: fosforilase B (97,0 kDa), albumina sérica bovina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e alfa-lactalbumina (14,4 kDa).

As corridas foram realizadas sob as condições de 15 mA por placa e 200 V, por um período médio de 3 horas, a 25 °C, utilizando a solução de Tris 0,025 M (pH 8,3) contendo glicina 0,192 M e 0,1% de SDS como tampão de corrida. As bandas proteicas foram visualizadas após protocolo de revelação a partir fixação e lavagem do gel em sucessivas soluções. Solução 1: etanol 30% (v/v) + ácido fosfórico 2% (v/v) fixação sob agitação moderada por 30 minutos, em seguida lavar o gel em ácido fosfórico 2% (solução 2) por 20 minutos sob agitação moderada, após descartar a solução 2 transferir o gel para uma solução de etanol 18% (v/v) + ácido fosfórico 2% (v/v) + Sulfeto de amônio 15% (p/v) (solução 3) deixando sob agitação moderada por 30 minutos, após esse tempo adicionar 2 ml de coomassie brilliant blue G-250 0,02g/ml por 48 h, em seguida lavar com água destilada para remover o excesso e estocar os géis em ácido acético 1%.

Cromatografia

A observação do perfil cromatográfico das proteases presentes no coalho de origem vegetal, coletado em dez regiões distintas, em períodos sazonais diferentes (chuvoso e seco), foi realizado em FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) AKTA pure 25L GE, utilizando coluna de troca catiônica Resource S 6ml. Os tampões utilizados na cromatografia, foram acetato de sódio 50 mM pH 5,0 (Tampão A) e acetado de sódio 50 mM pH 5,0 com NaCl 3M (Tampão B) Os tampões foram filtrados em filtro 0,45 µm e sonicados por 20 min.

Uma massa de 30 mg de coalho de origem vegetal proveniente de cada ponto de coleta foi solubilizado em 6 ml de tampão A, centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C e em seguida filtrados em filtro 0,22 µm. 6ml de cada amostra de concentração 5mg/ml, foi injetado no FPLC já previamente configurado nas condições da corrida cromatográfica.

Os dados obtidos das frações (ml) e leitura de UV a 280nm, foram tratados em planilhas do GraphPad Prism 7, para confecções de gráficos referentes aos picos cromatográficos das amostras.

5.1.2.3 Autólise

O ensaio de autólise visa o estudo quanto a capacidade das proteases presentes no coalho de origem vegetal, quando reconstituído em água, sofrerem auto-clivagem de suas enzimas e assim perderem atividade proteolítica parcial ou total. Inicialmente 20 mg de coalho de origem vegetal, foi homogeneizado sob vortexação, em 10 ml de água destilada que em seguida foi separado em frações iguais de 5 ml da solução enzimática, submetidas a condições diferentes de temperatura. As temperaturas estudadas foram ambiente (27°C) e refrigerada (8°C) ao longo de 24 horas, com análises em intervalos de 1h, 2h, 4h, 8h, 12h e 24h. Sendo o momento da reconstituição em água denominado T0.

Para cada intervalo de tempo, as amostras submetidas a temperaturas diferentes, foram analisadas quanto a sua atividade proteolítica específica a partir de alíquotas de 50 µl, seguindo mesmo protocolo anteriormente descrito. As leituras das absorbâncias a 420 nm foram anotadas juntamente com as leituras do ensaio colorimétrico de Bradford (1976), que quantifica proteínas a 595 nm. Os dados foram tratados através do GraphPad Prism 7.

As amostras testadas em tempos e temperaturas diferentes durante a autólise, paralelo ao ensaio proteolítico, foram tratadas com tampão de amostra 5x concentrado e aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) realizando eletroforese com o intuito de investigar os perfis proteicos situacionais quanto ao tempo e variação de temperatura.

5.1.2.4 Análises físico-químicas e microbiológicas

O estudo dos fatores físico-químicos e microbiológicos das proteínas do látex (PL), buscam investigar de forma comparativa padrões de qualidade, segundo legislações e regulamentações dos órgãos competentes, relacionados ao uso de enzimas na produção de gêneros alimentícios, principalmente laticínios que pudessem certificar o coalho de origem vegetal, como coagulante do leite na

fabricação de queijos.

5.1.2.4.1 Composição Centesimal

Os parâmetros estudados na determinação da composição centesimal do “pool” protéico do coalho de origem vegetal foram: umidade, cinzas, proteínas, lipídios totais e carboidratos, segundo as respectivas metodologias:

Umidade

Determinação de acordo com o método n. 44-15 da American Association of Cereal Chemistry (AACC, 1995). Através de secagem em estufa de circulação forçada de ar até peso constante com temperatura de 105 °C.

Cinzas

Segundo a metodologia descrita pela AACC (1995), método n. 08-01, com carbonização das amostras em chama direta e posterior calcinação em forno mufla a 550 °C durante 12 horas.

Proteínas

Determinação através da metodologia da AACC (1995), método n. 46-13, utilizando a determinação de nitrogênio total de Kjeldahl. A proteína bruta foi calculada utilizando-se o fator 5.70.

Lipídios totais

Segundo a metodologia da AACC (1995), método n. 30-25, sendo a extração direta da amostra com hexano em extrator contínuo do tipo Soxhlet. As amostras foram colocadas na quantidade aproximada de 1.5 g em cartuchos de extração, envolvidas em algodão. O cartucho contendo a amostra foi colocado no extrator e permaneceu por, aproximadamente, 24 horas destilando com refluxo. Após a destilação, o hexano foi removido do balão através de evaporação. O balão com o resíduo foi seco em estufa estática, a 105 °C, por aproximadamente 1 hora. O resíduo seco, resfriado em dessecador até a temperatura ambiente, foi então aferido o peso.

Carboidratos Totais

As quantidades de carboidratos presentes na amostra, foi determinada por diferença, com base na equação:

$$\text{Carboidratos totais (\%)} = 100\% - (\% \text{ de proteínas} + \% \text{ lipídios totais} + \% \text{ cinzas} + \% \text{ umidade})$$

5.1.2.4.2 Teor de Metais

Análises quanto ao teor de metais, em especial metais pesados, foram realizados na amostra do coalho de origem vegetal, através da Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará-NUTEC, laudo nº 1151/18 por meio de espectroscopia de plasma indutivamente acoplado de emissão óptica (ICP-OES), O método utilizado foi adaptado de AOAC Official Method 999.10, de acordo com o compêndio Brasileiro de Alimentação Animal nº 38. Milestone Application Note HPR-FO-07.

Em vial específico para o micro-ondas, foram pesados 0,5g da amostra e adicionado 7 ml de ácido nítrico 65% e 1 ml de peróxido de hidrogênio 30%, homogeneizado e fechado o “vial” com auxílio de um torquímetro, levado ao forno micro-ondas, onde permaneceu por 45 min a 200°C; Retirou-se o “vial” do micro-ondas, deixando esfriar a temperatura ambiente por 15 minutos; O “vial” foi então aberto e a solução transferida e para um tubo tipo Falcon e completado o volume até 50 mL, realizou-se a leitura no ICP-OES. As leituras foram realizadas em duplicata.

5.1.2.4.3 Análises microbiológicas

Os parâmetros microbiológicos estudados foram *Salmonella sp.*, *Coliformes* a 45°C e *Escherichia coli*, de acordo com a metodologia da American Public Health Association (APHA)/compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, 2001. A amostras de coalho de origem vegetal foi analisada no laboratório de microbiologia de alimentos-LMA DEAL/CCA/UFC, laudo nº 406/2018, segundo os padrões microbiológicos sanitários para alimentos (Anvisa, 2001/RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001.

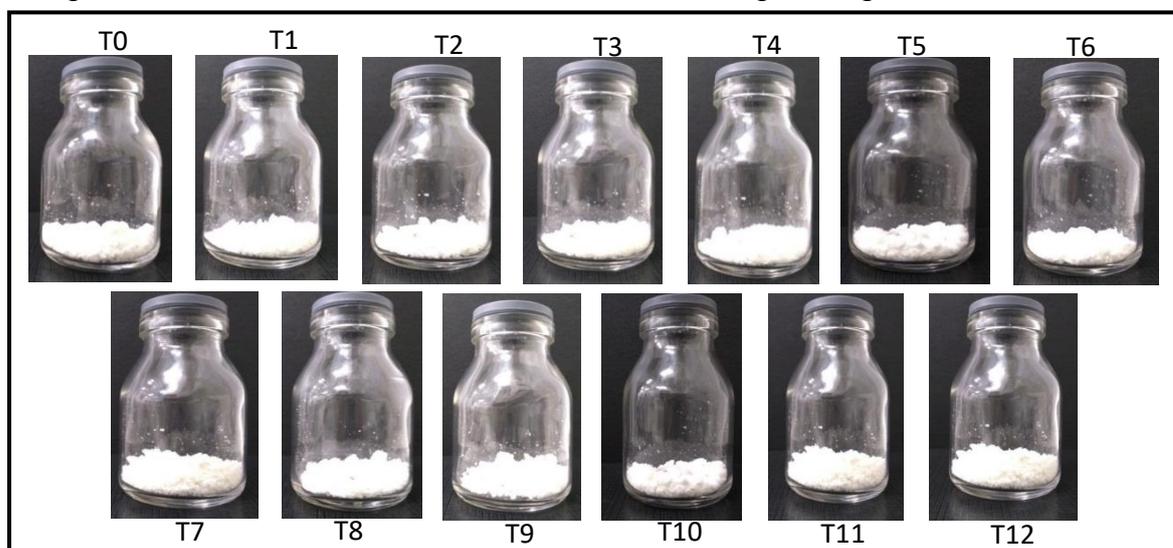
5.2 Resultados e Discussões

5.2.1 Avaliação da Estabilidade do Coalho Vegetariano - Teste de Prateleira.

Aparência

O lote de coalho de origem vegetal oriundo das proteínas do látex (PL) de *Calotropis procera* confinado por doze meses (T0 a T12) onde se avaliou inicialmente a cor e aspectos físicos, em relação às proteínas do látex não armazenadas, mostrou que mesmo após o 12º mês não houve nenhuma variação física em sua coloração, que pudessem evidenciar traços de oxidação ou qualquer outra variação físico-química em seu aspecto (FIGURA 12). Esse dado corrobora com os resultados de Costa, 2016 ao avaliar a estabilidade de armazenamento de uma proteína isolada de Noni (*Morinda Citrifolia L.*) ao abrigo da luz, onde a manutenção da cor foi observada durante o período de 6 meses do experimento.

Figura 12 – Teste de estabilidade do coalho de origem vegetal.



(T0): Momento inicial que ocorreu o armazenamento do coalho de origem vegetal. (T12): Tempo final (12 meses) de armazenamento.

Fonte: Próprio autor

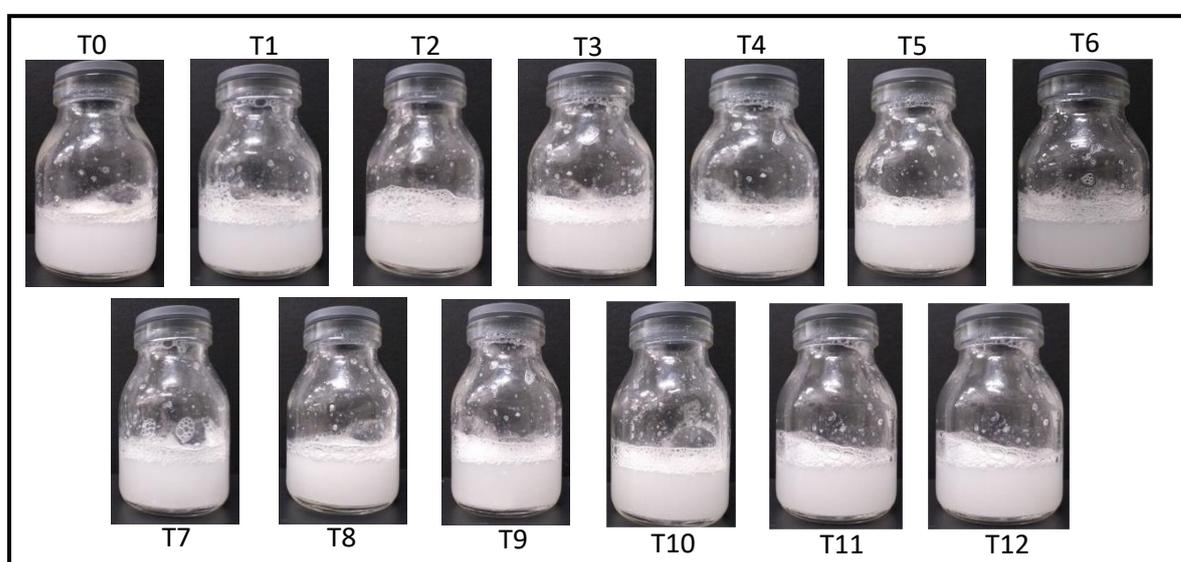
Solubilidade

Considerando o parâmetro solubilidade, observou-se que o coalho de origem vegetal, foi facilmente reconstituído em água destilada em todos os períodos de armazenamento do experimento. A concentração inicial de coalho vegetariano em

todo experimento de estabilidade foi de 1mg/ml. A dissolução em água destilada do coagulante vegetal (coalho vegetariano) foi imediata, com formação de solução de aspecto turvo, porém sem a presença de agregados proteicos ou precipitados (FIGURA 13).

Segundo Costa, 2016 “A solubilidade de uma proteína transferidora de lipídios (McLTP1), isolada das sementes de Noni (*Morinda citrifolia* L.), foi facilmente reconstituída em água destilada em todas as condições de armazenamento do experimento”.

Figura 13 – Estudo de solubilidade do coalho de origem vegetal.

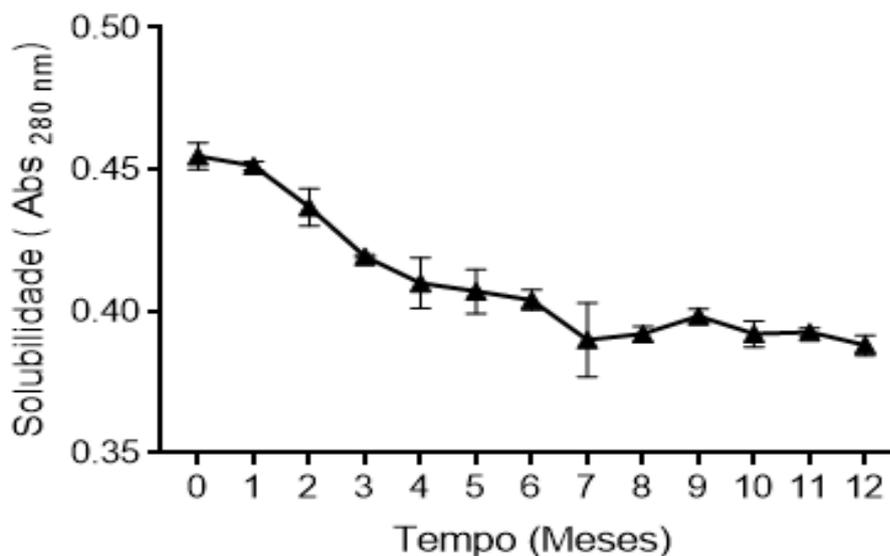


(T0): Momento inicial que ocorreu o armazenamento do coalho de origem vegetal. (T12):Tempo final (12 meses) de armazenamento.

Fonte: Próprio autor

Os resultados evidenciaram que a solubilidade pouco variou em termos gerais ao longo de 12 meses ($\pm 0,05$ nm), sendo que nos três primeiros meses (T0 a T4) houve um decréscimo mais acentuado da solubilidade, que se manteve praticamente constante nos meses seguintes (T5 a T12). Tais resultados são importantes nesse estudo, pois demonstra a facilidade e manutenção da suspendabilidade do coalho de origem vegetal mesmo após 12 meses de estocagem (FIGURA 14).

Figura 14 – Variação mensal da solubilidade do coalho vegetariano reconstituído em água após 12 meses.

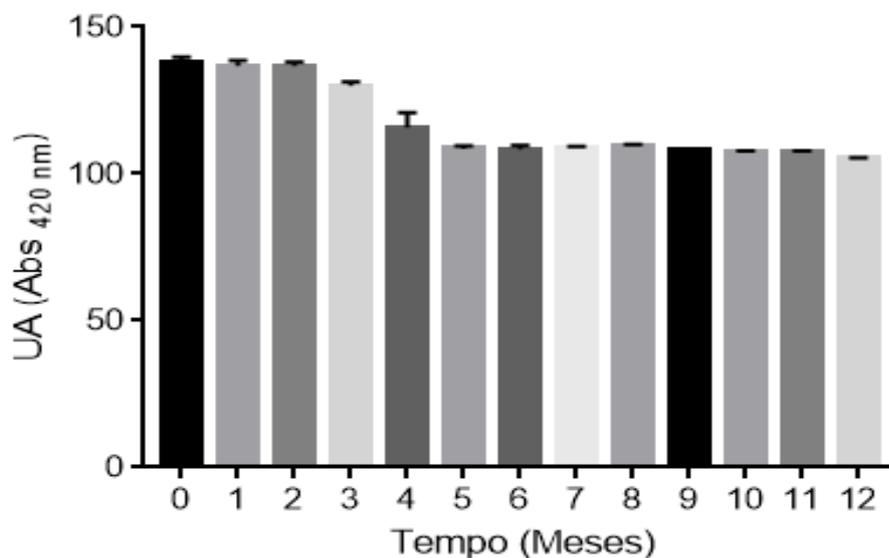


Coalho vegetariano reconstituído em água destilada pH 6,6, centrifugação nas condições de $10.000 \times g/4^{\circ}C/10$ min; Concentração 1mg/ml; ensaio realizado em triplicata; Média \pm desvio padrão

Atividade Proteolítica in vitro

A atividade proteolítica manteve-se estável nos dois primeiros meses apresentando os maiores valores, entre o 3^o e 4^o mês de armazenamento a atividade proteolítica do coalho de origem vegetal sofre um discreto decréscimo e se mantém constante, entre o 5^o e 12^o mês de armazenagem. Mesmo após 5 meses de armazenamento até o final do experimento, verificou-se que as proteínas do látex (PL) presentes no coalho de origem vegetal se mantêm eficazes, no seu propósito de coagulação do leite na fabricação de queijos, o que será demonstrado em outros experimentos nessa pesquisa (FIGURA 15).

Figura 15 - Atividade proteolítica mensal do coalho de origem vegetal ao longo de 12 meses.



Atividade proteolítica expressa em UA utilizando substrato inespecífico azocaseína 1%; Concentração 1mg/ml; Ensaio realizado em triplicata; Média \pm desvio padrão.

Os dados obtidos corroboram com o relatado por Leite, 2016 ao estudar as atividades proteolíticas *in vitro* das laticíferas *Calotropis procera*, *Cryptostegia grandiflora* e *Carica papaya*.

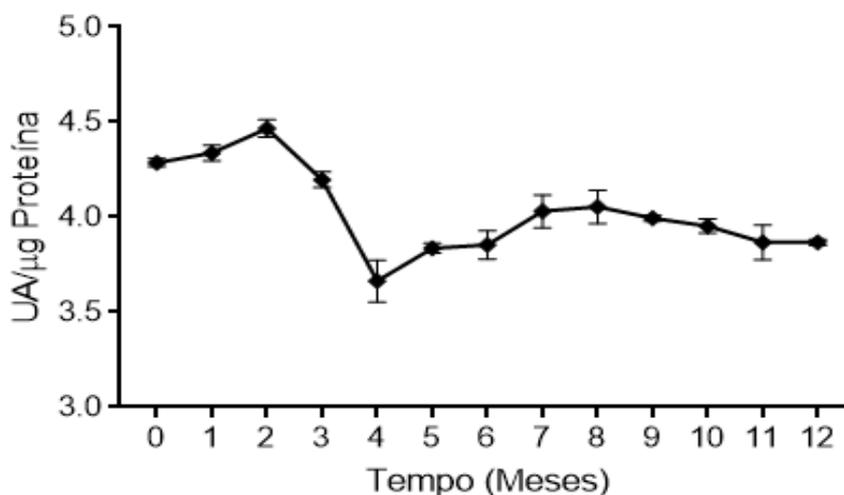
Segundo Freitas, 2006 o látex de *C. procera* possui enzimas cisteínicas e sérnicas do tipo quimotripsina, pois tiveram a capacidade de degradar os substratos BANA e azocaseína em pH 7,5.

A escolha da L-cisteína como ativador das peptidases presentes no coalho de origem vegetal, deveu-se ao fato de ser um aminoácido natural, não tóxico e que pode ser utilizado como aditivo alimentar (ZHAO et al., 2014).

Atividade Específica (UA/ μ g de proteína)

Os resultados mostraram que ao longo de 12 meses de armazenamento, as proteínas do coalho de origem vegetal e em particular as suas enzimas, não perdem sua atividade enzimática, podendo ser estocada por igual período sem prejuízos com a qualidade e eficácia de seu uso (FIGURA 16).

Figura 16 – Atividade específica de um lote de coelho vegetariano armazenado por 12 meses.



Concentração da amostra 1mg/ml a partir de alíquotas de 50 μ l;
 Ensaio realizado em triplicata. Dados apresentados como média \pm erro padrão.

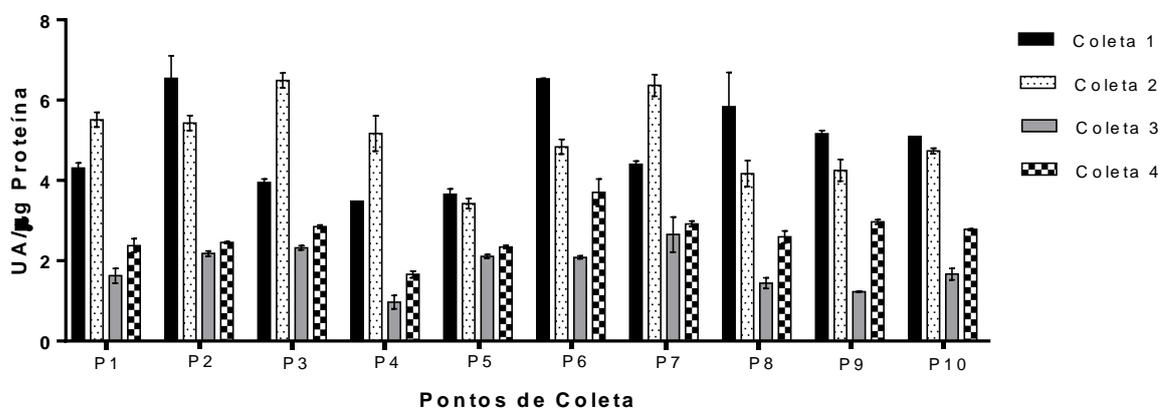
Bezerra, 2017 ao estudar a atividade específica de amostras das proteínas do látex (PL) de *C. procera* obteve média de atividade específica de 3,9 UA/ μ gP.

5.2.2 Variabilidade sazonal e temporal nas coletas de *Calotropis procera*

Atividade Enzimática Específica

Os maiores valores de atividade específica em todos os pontos de coleta, foram observados no período chuvoso (coleta 1 e 2) em relação ao período de estiagem (coletas 3 e 4). Os maiores e menores valores de atividade específica no período chuvoso, foram obtidos em P2 (Rio Coaçu) e em P5 (Lagoa do Genipabu), respectivamente. No período de estiagem em P7 (Mangue de Iparana) e P4 (Campus do Pici), respectivamente (FIGURA 17).

Figura 17 – Atividade específica do coalho de origem vegetal coletado por 12 meses em 10 pontos geograficamente distintos.



Coletas realizadas em 10 pontos distintos em Fortaleza-CE e região metropolitana de Eusébio-CE e Caucaia-CE. As coletas 1 e 2 ocorreram no período de chuvas e as coletas 3 e 4 no período de estiagem. Valores expressos como média \pm erro padrão.

A variação da atividade específica das proteases presentes no látex de *Calotropis procera*, quando se observa coletas realizadas em 10 regiões, geograficamente diferentes e em situações geomorfológicas bem distintas como urbana, próximo a lagoas e rios e em faixa de praia e campo de dunas, levando em consideração ainda períodos de sazonalidade de chuvas entre as coletas permite concluir qual a melhor situação geoclimática mais viável à coleta do látex que será utilizado no processamento do coalho de origem vegetal.

A variação da atividade específica também foi observada quando os pontos foram agrupados em zonas de coleta e não foram observadas diferenças significativas entre coletas realizadas em zonas diferentes, em relação aos períodos chuvoso e seco. Em relação aos pontos de coleta compreendidos na zona urbana, observou-se diferenças entre coletas, realizadas no período chuvoso em relação ao período seco e ainda diferença entre a primeira e a segunda coleta, realizada no período chuvoso, o que não foi observado nas coletas durante o período seco (TABELA 9).

Tabela 9 – Estudo da atividade específica do coalho de origem vegetal, quando coletado em zonas diferentes e em situações climáticas distintas.

Pontos de Coleta	Zonas	Atividade Específica (UA/ μ gP)			
		Período Chuvoso		Período Seco	
		1	2	1 [3]	2 [4]
P1, P3 e P4	Urbana	3,91 \pm 0,42Aa	5,73 \pm 0,68Ba	1,64 \pm 0,67Ca	2,30 \pm 0,60Ca
P2, P5 e P6	Águas Interiores (Rios e Lagoas)	5,58 \pm 1,66Aa	4,56 \pm 1,03ABa	2,12 \pm 0,05Ba	2,83 \pm 0,75Ba
P7, P8, P9 e P10	Faixa de Praia e Campo de Dunas	5,13 \pm 0,59Aa	4,88 \pm 1,02Aa	1,75 \pm 0,63Ba	2,82 \pm 0,17Ba

Agrupamento dos pontos de coleta em zonas. Para cada período climático foram realizadas duas coletas. Valores expressos como média \pm desvio padrão. Letras maiúsculas referem-se às linhas e letras minúsculas às colunas. Letras diferentes indicam amostras diferentes pelo T Test seguido de Mann Whitney/Unpaired a 5% de probabilidade.

Comportamento semelhante foi observado entre as coletas no entorno de rios ou lagoas e em faixa de praia ou campos de dunas, não se observando diferenças entre coletas realizadas no mesmo período, porém observa-se diferenças significativas, entre coletas realizadas em períodos diferentes em relação a uma mesma zona.

Vários trabalhos concluem que ocorrem diferenças estruturais e bioquímicas, observadas principalmente em plantas por serem indivíduos sésseis, quando sofrem variações climáticas como temperatura e pluviosidade.

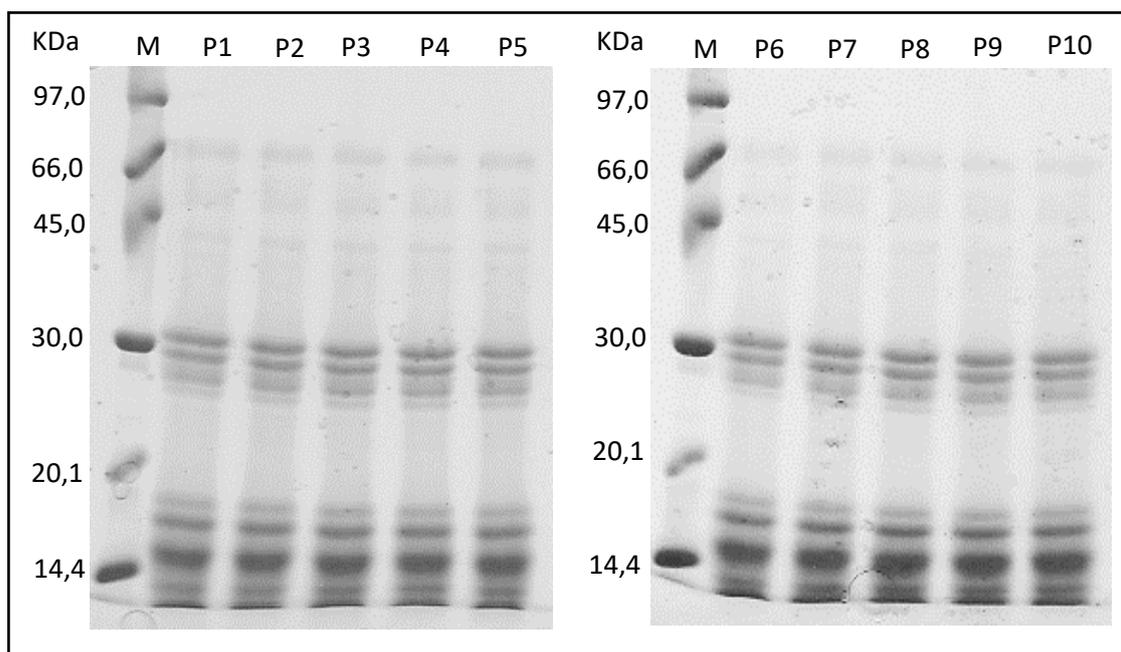
Segundo Larcher (2006), A redução da temperatura leva a uma diminuição da velocidade de reações químicas vitais das plantas, além de tornar as biomembranas mais rígidas, sendo necessária maior quantidade de energia para ativar processos bioquímicos.

Como o coalho de origem vegetal é processado a partir do látex de *Calotropis procera*, observa-se comportamento semelhante em relação a seringueira (*Hevea brasiliensis*), de acordo com Mesquita *et al.* (2006), “Dentre os vários fatores que influenciam a produção e qualidade do látex da seringueira, o estado hídrico da planta é um dos que se destaca”.

Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Não se observou diferenças nos perfis eletroforéticos das proteínas presentes no coalho de origem vegetal, quando coletado em regiões distintas, mesmo em condições de clima e solo diferentes, bem como na presença ou ausência de atividade antrópica pelo qual a planta estaria sujeita. (FIGURA 18).

Figura 18 – Perfil eletroforético do coalho de origem vegetal coletado em 10 pontos de coleta distintos.



Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% de PL: proteínas do látex do Coalho de origem vegetal. (P1 a P10) pontos de coleta. (M) Marcadores de massa molecular. Foram aplicados 25 µl do coalho de origem vegetal no interior de cada poço, a partir de soluções de 1 mg/ml + betamercaptoetanol.

Esses resultados corroboram com Freitas, 2017, quando estudou o perfil eletroforético das proteínas do látex (PL) de *C. procera* e seus picos cromatográficos (PI e PII), onde as bandas observadas tanto no LP quanto nos picos PI e PII foram da ordem de 30 KDa.

Cromatografia

O coalho de origem vegetal, obtido a partir da fração proteica de *Calotropis procera* coletado em 10 regiões diferentes e em períodos climáticos (seco e chuvoso) foi submetido a fracionamento de suas proteínas, através de cromatografia de troca

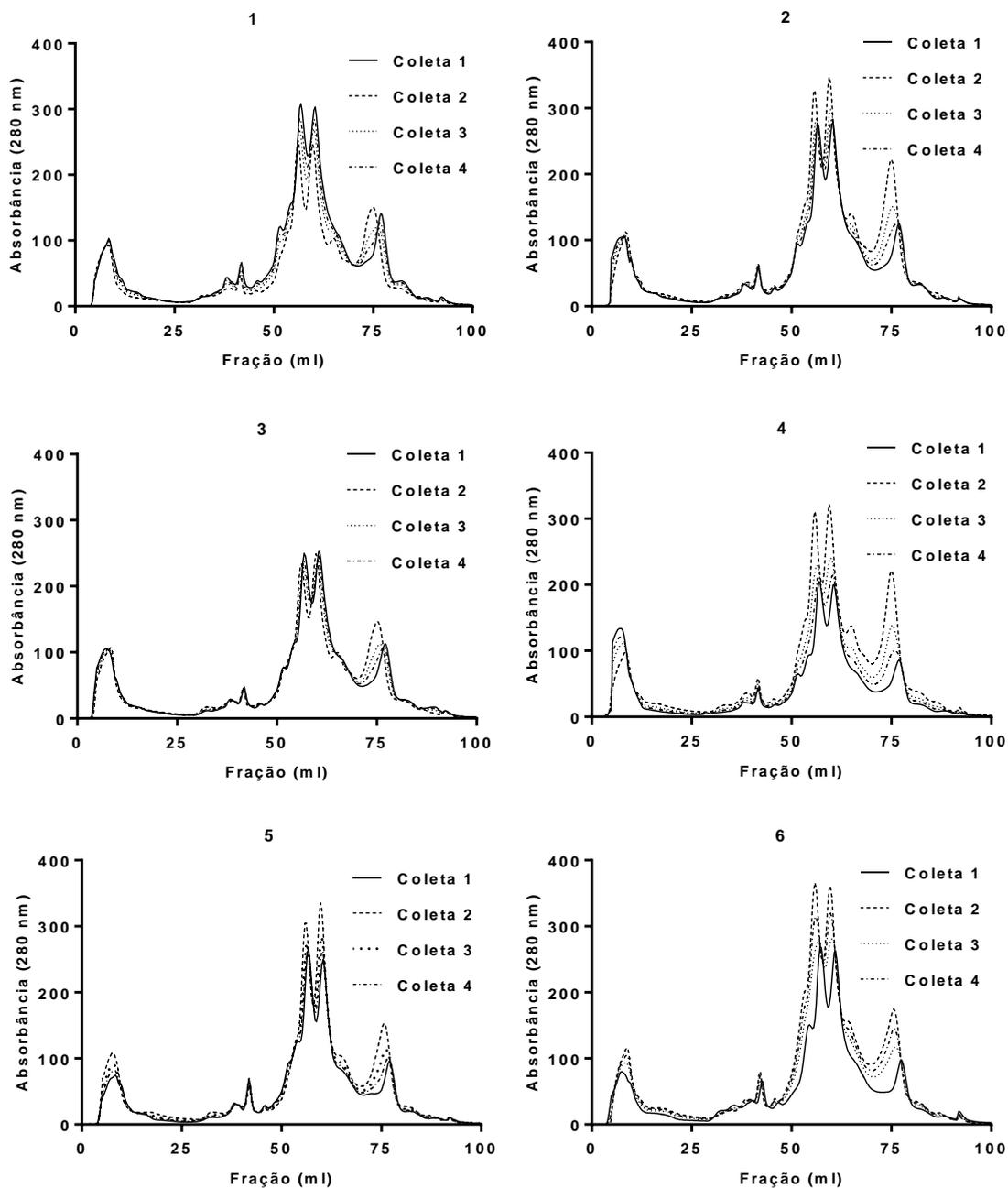
iônica em coluna *Resource S*, acoplada em sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (FPLC).

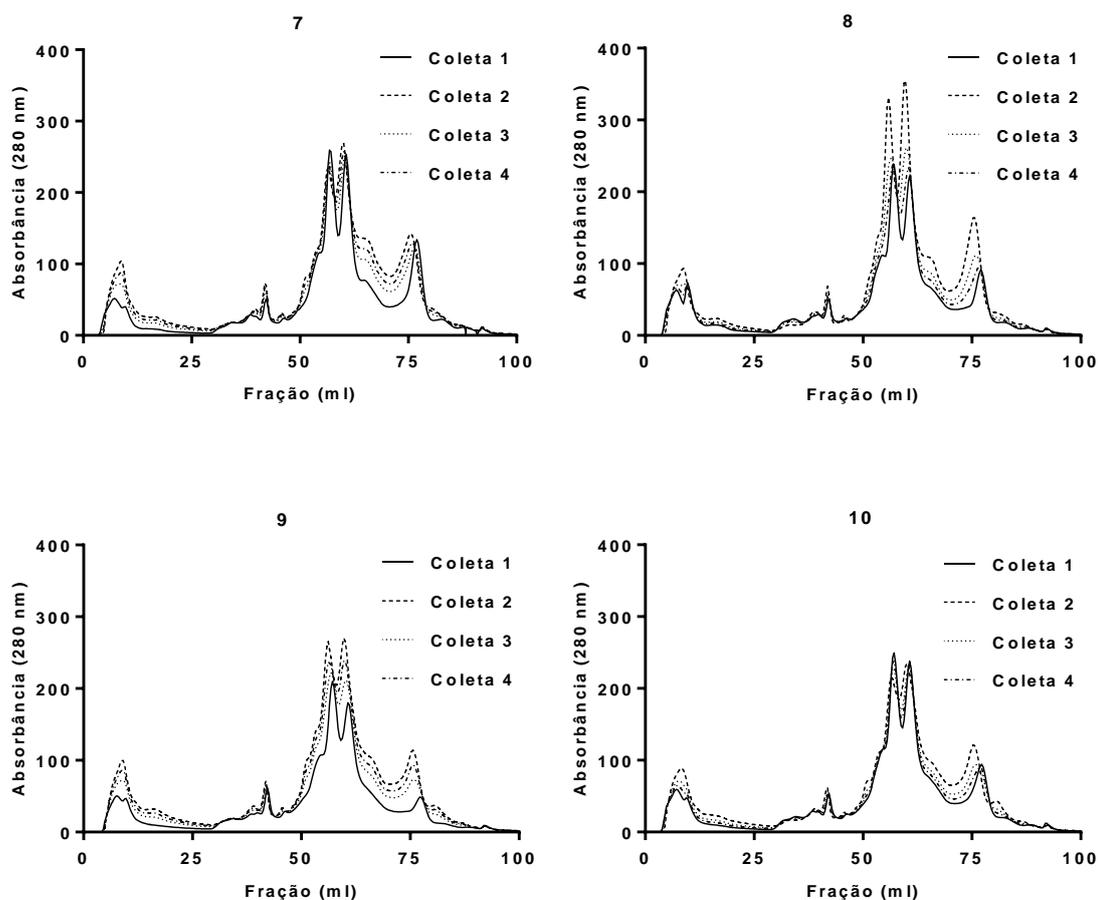
Cromatografias de troca iônica tem sido rotineiramente utilizadas na purificação de diversas proteases de látex vegetal (MORCELE *et al.*, 2004; FONSECA *et al.*, 2010; TORRES *et al.*, 2012).

Os cromatogramas referem-se aos 10 pontos de coleta previamente georreferenciados. Quatro coletas foram realizadas, respeitando a sazonalidade climática sendo as coletas 1 e 2 referentes ao período seco ou de estiagem e as coletas 3 e 4 ao período chuvoso (FIGURA 19).

Não se observou a partir dos cromatogramas, diferenças entre os picos inerentes às proteínas presentes no coalho de origem vegetal, mesmo quando coletado em pontos diferentes e em estações distintas (período seco e chuvoso).

Figura 19 – Cromatografias das amostras de coalho vegetariano em situações de sazonalidade climática e geográfica distintas.





Coletas realizadas em 4 situações pluviométricas e climáticas distintas (coletas 1 e 2 início e término de período chuvoso e coletas 3 e 4 início e término de período seco); 10 pontos geográficos diferentes em 3 zonas geomorfológicas semelhantes (urbana, águas interiores e zona costeira); Cromatografia de troca iônica das proteínas do coalho de origem vegetal, em coluna *Resource-S* 6 ml, calibrada com tampão acetado de sódio 50 mM pH 5,0, proteínas retidas foram eluídas com gradiente linear de NaCl (0,1-1M) em tampão acetado de sódio 50 mM (pH 5,0) e fluxo 1ml/min.

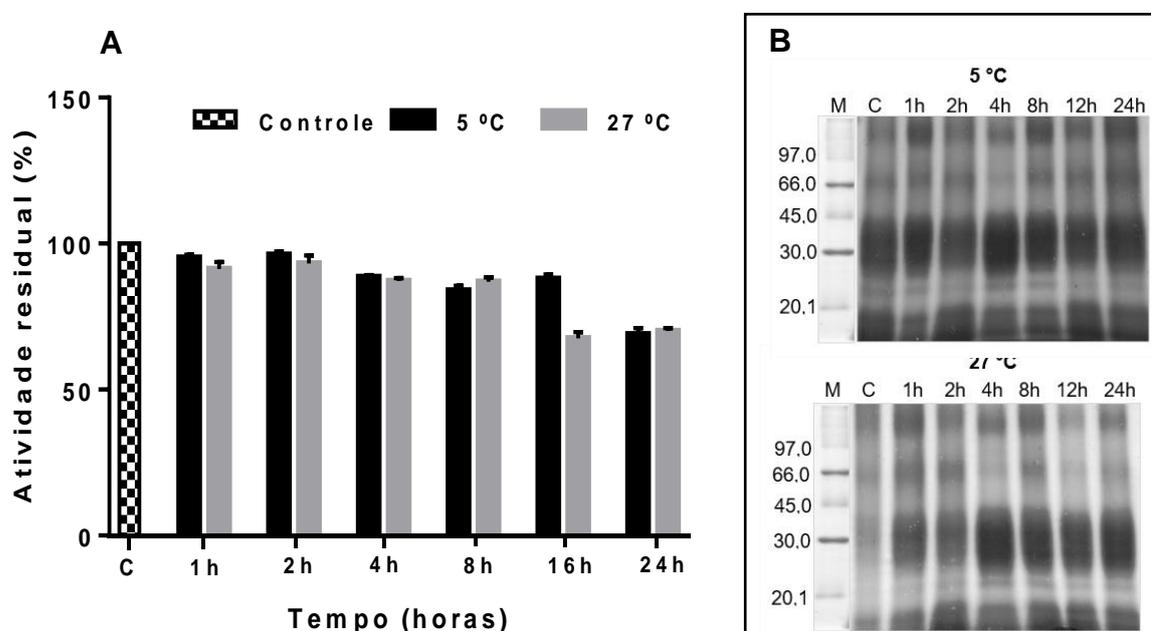
Os perfis obtidos nas coletas, são semelhantes aos picos obtidos por Silva, 2014 quando estudou as proteases do látex de *Calotropis procera*, isolando três proteínas purificadas, CpCP-1, CpCP-2 e CpCP-3.

Apesar da similaridade nos perfis dos picos cromatográficos, observa-se que os maiores valores de absorbância, foram obtidos na coleta 2, referente ao período em que a planta recebeu um maior aporte de água, ao final da quadra invernal (período chuvoso). Perfis cromatográficos idênticos foram evidenciados por Bezerra, 2017 e Viana, 2015 quando estudaram o perfil cromatográfico e eletroforético das proteínas do látex (PL) e picos de *C. procera*.

5.2.3 Autólise

Peptidases podem ser ativadas ou sofrerem autólise, dependendo de fatores como o tempo e a temperatura de armazenamento (CHEN *et al.*, 2013). Amostras de coalho de origem vegetal, foram testadas quanto a sofrerem ou não autólise, em duas condições de armazenamento (5 °C e 27 °C). No mesmo ensaio verificou-se a atividade proteolítica residual (%), após cada tempo (1, 2, 4, 8, 16 e 24h) (FIGURA 20).

Figura 20 – Autólise e atividade proteolítica residual (%) do coalho de origem vegetal.



(A) Efeito do tempo na atividade proteolítica do coalho de origem vegetal. As amostras foram reconstituídas em água destilada pH 6,7, contendo L-cisteína 1 mM (2 mg/ml) e os ensaios proteolíticos foram realizados com substrato azocaseína 1% e amostras em duas condições de temperatura (5 °C e 27 °C) após 1, 2, 4, 8, 12 e 24h e incubadas por 1h a 37 °C. Cada valor representa a média de três experiências independentes e as barras de erro indicam erro padrão da média. **(B)** Efeito do tempo na autólise proteica em duas temperaturas de estocagem (5 °C e 27 °C) das proteínas do coalho de origem vegetal realizadas por 12,5% de SDS-PAGE. Foram adicionados 30 µg de proteína em cada poço. Legenda: Controle (C) e Marcador molecular (M).

A atividade proteolítica do coalho de origem vegetal, permaneceu estável (100%) em relação ao controle, tanto a 5 °C quanto a 27 °C nas primeiras 2 horas sofrendo redução de atividade a partir de 4 h, chegando a \pm 70% após 24 horas.

Menores valores de atividade residual são observados quando a solução de coalho vegetariano é estocada a 27 °C (FIGURA 26A).

Freitas, 2016 quando estudou a atividade residual (%) das frações proteicas de *Calotropis procera* e *Cryptostegia grandiflora*, concluiu que a atividade proteolítica das frações, permaneciam estáveis (100%) a 37 °C por 8 h, somente após 24 e 48h, houve considerável perda de atividade (20-80%) dependendo da fração do látex. Por outro lado, uma fração do látex de *Euphorbia nivulia* apresentou baixa estabilidade, mantendo apenas 20% de sua atividade residual após 10 minutos de incubação a 40 °C (BADGUJAR & MAHAJAN, 2014).

A autólise das frações proteolíticas do coalho de origem vegetal foi analisada por SDS-PAGE não apresentando alterações no conteúdo de proteínas (autodigestão), mesmo após 24 horas de incubação a 5 ° C e 27 °C, indicando alta estabilidade e potencial uso na indústria de alimentos, nesse estudo especificamente na fabricação de queijos (FIGURA 26B).

5.2.4 Análises físico-químicas e microbiológicas

O coalho de origem vegetal foi submetido a análises físico-químicas e bacteriológicas, fundamental quando se destina um produto à indústria de alimentos, máxime indústria de laticínios. Padrões de qualidade fundamentados em legislações vigentes, quanto a parâmetros microbiológicos e métodos estabelecidos, foram utilizados como padrão nos ensaios realizados no coalho de origem vegetal.

5.2.4.1 Composição centesimal

Definiu-se composição centesimal do coalho de origem vegetal a partir da determinação dos parâmetros: umidade, cinzas, proteínas, lipídios totais e carboidratos. (TABELA 10).

Tabela 10 – Composição centesimal (%) do coalho de origem vegetal.

Parâmetros	Composição Centesimal (%)
Umidade	8,16 ± 0,10
Cinzas	2,82 ± 0,08
Gordura	8,31 ± 0,52
Proteínas	80,71 ± 0,09
Carboidratos	Não Detectado

Amostra de coalho vegetariano liofilizado (30g). Valores expressos como média ± erro padrão.

Observa-se teor considerável de proteínas presentes na constituição do coalho vegetariano, sendo grande parte de proteinases cisteínicas.

Relata-se a ocorrência de inúmeras proteinases no látex de diversas espécies do gênero *Euphorbia* essas proteinases são classificadas como sendo do tipo serínicas (LYNN & CLEVETTE-RADFORD, 1987b).

5.2.4.2 Teor de Metais

Análises quanto a contaminantes inorgânicos se fizeram necessário a partir do decreto nº 55871/66 publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que avalia os limites máximos de tolerância de metais pesados nos alimentos, aditivos e preparações enzimáticas.

Sabendo que o objeto desse estudo é o uso do coalho de origem vegetal na preparação de queijos, obteve-se os teores de metais pesados no coalho em comparação aos limítrofes estabelecidos pela legislação vigente (TABELA 11). Outros contaminantes inorgânicos foram analisados (ANEXO A).

Tabela 11 – Contaminantes inorgânicos (metais pesados) presentes no coalho de origem vegetal.

Parâmetros	Resultados Obtidos* (mg/100g Protease)	Limite Máximo Tolerável** (mg/100g Protease)
Antimônio	0,135 ± 0,041	0,2
Arsênio	<LD	0,1
Cádmio	0,002 ± 0,000	0,1
Chumbo	0,004 ± 0,000	0,1
Cobre	0,394 ± 0,008	3,0
Estanho	0,020± 0,002	25,0
Níquel	0,275 ± 0,021	0,5
Zinco	1,184 ± 0,045	5,0

*Laudo nº 1151/18, por meio de espectroscopia de plasma indutivamente acoplado de emissão óptica (ICP-OES), análises realizadas pelo NUTEC/GETAQ/NUTEA (ANEXO A); ** decreto nº 55871/65 e RDC nº 42/2013 (ANVISA); Análises realizadas em duplicata.

Podem ser observados que todos os metais encontrados no coalho de origem vegetal, apresentaram valores inferiores ao limite tolerável. Os metais pesados cádmio, cromo e chumbo apresentaram valores bem inferiores aos limítrofes, deve-se levar em consideração que as partes da planta em que se coleta o látex, matéria prima do coalho de origem vegetal, são as regiões aéreas de caules e frutos, dessa forma segundo Gonçalves *et al.*, (2015) as maiores concentrações de metais pesados não estão presentes nas partes aéreas das plantas e sim nas raízes, sendo o principal órgão de acesso e acumulação desses elementos.

5.2.4.3 Análises Microbiológicas

Com o intuito de avaliar a qualidade do coalho de origem vegetal, realizou-se um ensaio microbiológico objetivando cumprir os padrões estabelecidos pela Resolução – RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001- Ministério da Saúde, BRASIL (2001).

Os parâmetros microbiológicos estudados foram *Salmonella sp.*, *Coliformes 45°C* e *Escherichia coli* (TABELA 12).

Tabela 12 – Análise microbiológica realizada no leite, Coalho vegetal, queijo vegetariano e queijo comercial.

Parâmetros	Coalho de origem vegetal*	Padrões microbiológicos e sanitários para alimentos (ANVISA, 2001)**
<i>Salmonella sp.</i>	Ausência	Ausência
<i>Coliformes 45°C</i>	10 ²	10 ²
<i>E. Coli</i> (UFC/g)	<10,0	Não Especificado

* Amostra de 30g de coalho de origem vegetal analisada no laboratório de Microbiologia de Alimentos-LMA DEAL/CCA/UFC, laudo nº 406/2018, segundo American Public Health Association (APHA)/compendium of methods for the microbiological examination of foods.

**Resolução – RDC Nº12, de 2 de janeiro de 2001_ Ministério da Saúde, BRASIL (2001).

Para todos os parâmetros estudados, não se verificou qualquer tipo de contaminação, estando a amostra de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pela ANVISA RDC Nº 12/2001. A presença de *Coliformes 45°C*, pode ser utilizada como um indicativo da possível presença de patógenos como *Escherichia coli*, que pode causar riscos à saúde dos consumidores (SALOTTI et al., 2006; NUNES et al., 2013).

Torna-se fundamental estudo microbiológico dos insumos que devem ser utilizados na produção de alimentos, máxime os laticínios que apresentam, em virtude do uso de leite, grande facilidade de contaminação, Fonseca e Santos, (2000) descreveram uma ampla variedade de problemas relacionados à qualidade de produtos lácteos pode estar associada à ação das lipases e proteases de origem microbiana, como alteração do sabor e odor do leite.

No caso de queijos, objeto dessa pesquisa, fatores como umidade e atividade de água, são variáveis que devem ser levadas em consideração em análises microbiológicas de alimentos. Altos teores de umidade reduzem o valor nutricional de queijos e favorecem a multiplicação bacteriana decorrente da elevada atividade de água do produto (CARVALHO, 2003).

5.3 Conclusão

Independentemente do local ou época do ano em que se realize a coleta do látex de *Calotropis procera*, não se observa diferenças significativas quanto à qualidade e funcionalidade das proteases ali presentes.

As proteínas do látex de *C. procera* aqui denominadas coalhos de origem vegetal, após liofilização e correto armazenamento, sofrem pouca variação quanto às suas características físicas e físico químicas iniciais, mesmo após 12 meses de armazenamento. Quando reconstituída em água, as proteínas do látex de *C. procera*, mantém atividade após 24 horas, com melhor manutenção quando armazenadas sob refrigeração ($\pm 8^{\circ}\text{C}$).

6 UTILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* COMO COALHO DE ORIGEM VEGETAL NA FABRICAÇÃO DE QUEIJOS.

6.1 Metodologia

A eficiência do coalho de origem vegetal, foi verificada quanto a estudos de coagulação do leite e poder ou força de coagulação enzimática, em comparação à coalhos comerciais, cujos poderes de coagulação são de conhecimento prévio.

6.1.1 Atividade de coagulação do leite

Leite “in natura” foi utilizado após processo de pasteurização lenta (Brasil, 1997) quando aquecido entre 62 e 65 °C por 30 minutos, após resfriamento a 40°C adicionou-se cloreto de cálcio 40% na proporção de 500µl CaCl₂/1L leite, devolvendo íons Ca⁺⁺ perdidos no processo de pasteurização.

Inicialmente 10 mg de coalho de origem vegetal foi solubilizado em 5 ml de água contendo L-cisteína 0,1 mM, alíquotas de 20, 30, 40 e 60 µg foram testadas em 2 mL de leite incubado em tubos de ensaio a 39 °C. Os coalhos comerciais Coalhopar® e Halamix®, foram utilizados como controle. As concentrações iniciais dos coalhos comerciais, seguiu-se a orientação do fabricante. Após adicionar o coalho de origem vegetal ao leite, aferiu-se o tempo até que houvesse a formação dos primeiros coágulos, aderidos às paredes dos tubos.

6.1.2 Poder ou força de coagulação

A força de coagulação do coalho de origem vegetal, foi determinada de acordo com SEVERINSEN (1979). Um volume de 500 ml de leite “in natura” pasteurizado e mantido a 39°C, adicionou-se 250µl de CaCl₂ e 15 mg de coalho de origem vegetal. Observou-se o tempo necessário para o aparecimento dos primeiros sinais de coágulo. A força (F) do coalho de origem vegetal foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$F = \frac{L \times 2.400}{C \times T}$$

Em que:

F = Força de Coagulação

L = Volume de leite utilizado (ml)

C = Quantidade de coagulante adicionado (g)

T = Tempo de coagulação (s).

Para fins de comparação, utilizou-se os coagulantes comerciais a base de quimosina de bezerro (Coalhopar) e quimosina microbiana obtida do fungo *Aspergillus niger* (Halamix).

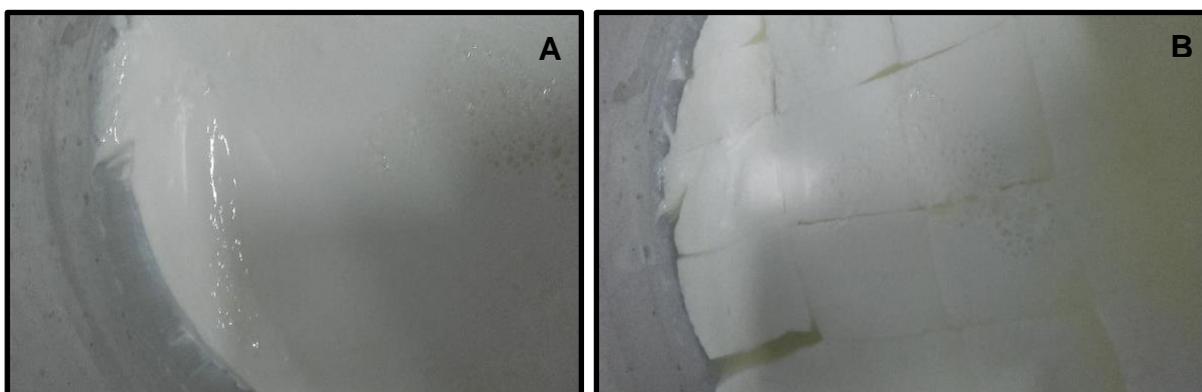
6.2.3 Fabricação *in loco* do queijo formulado com coalho de origem vegetal.

Após ajuste na quantidade limítrofe de coalho de origem vegetal, necessária à coagulação do leite em até 50 minutos, realizou-se a produção de um queijo “piloto” que seguiu o método descrito por NASSU (2006).

Na confecção do queijo formulado com coalho de origem vegetal, foram utilizados 2 litros de leite “in natura” pasteurizado de forma lenta por 30 minutos mantido a uma temperatura de ± 65 °C. Na preparação da solução do coalho de origem vegetal inicialmente se faz necessário a ativação das peptidases cisteínicas, então 3,6 mg de L-cisteína 1 mM foram solubilizados em 30 ml de água destilada aguardando 10 minutos antes da adição ao leite. 1 ml de CaCl₂ 40% foi adicionado após o processo de pasteurização.

Após pasteurização lenta e adição de cloreto de cálcio ao leite já a uma temperatura de ± 38 °C, adicionou-se sob mexedora a solução coagulante, o leite então ficou em repouso por 50 minutos. Na Figura 21A, verifica-se a formação de uma coalhada lisa e consistente e “cortada” em cubos para liberação do soro lácteo (FIGURA 21 B).

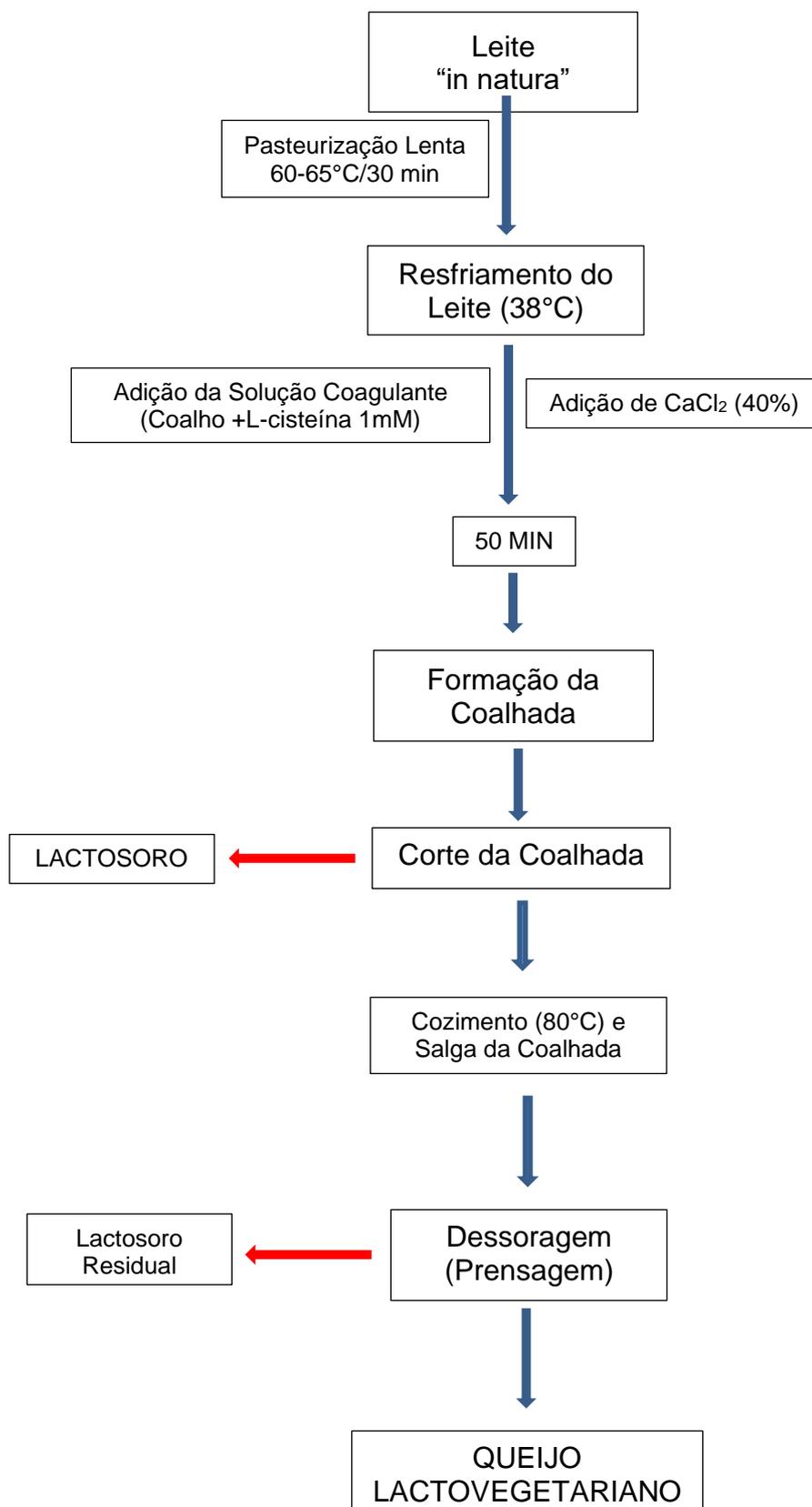
Figura 21 – Processo de coagulação do leite (A) e corte da coalhada (B) na produção de queijo “piloto” lactovegetariano.



Fonte: Próprio autor

Após o corte da coalhada, desenvolveu-se uma mexedura para liberação de todo conteúdo de soro que foi separado da coalhada por meio de peneira e transferido a um outro recipiente para aquecimento a 80°C quando é então novamente transferido à coalhada promovendo assim o “cozimento” da mesma. Esse processo foi repetido até que os coágulos adquirissem uma consistência elástica, quando então foi ultimamente separado do soro e adicionado aos mesmos 5g de sal de cozinha sob leve mexedora.

Após a salga da coalhada, inicia-se então o processo final da fabricação do queijo, denominado de dessoragem (prensagem), quando a coalhada é transferida para formas artesanais de PVC com pequenos furos de 6 mm, para que todo conteúdo de soro possa ser eliminado. O processo de dessoragem levou em média 9 horas. Após a liberação de todo soro residual, os queijos foram desenhados e mantidos sob refrigeração, até que foram pesados e embalados à vácuo para análises futuras. Todas as etapas da produção *in loco* do queijo lactovegetariano pode ser visualizado no fluxograma (FIGURA 22).

Figura 22 – Processamento *in loco* de queijo lactovegetariano

Fonte: Próprio autor

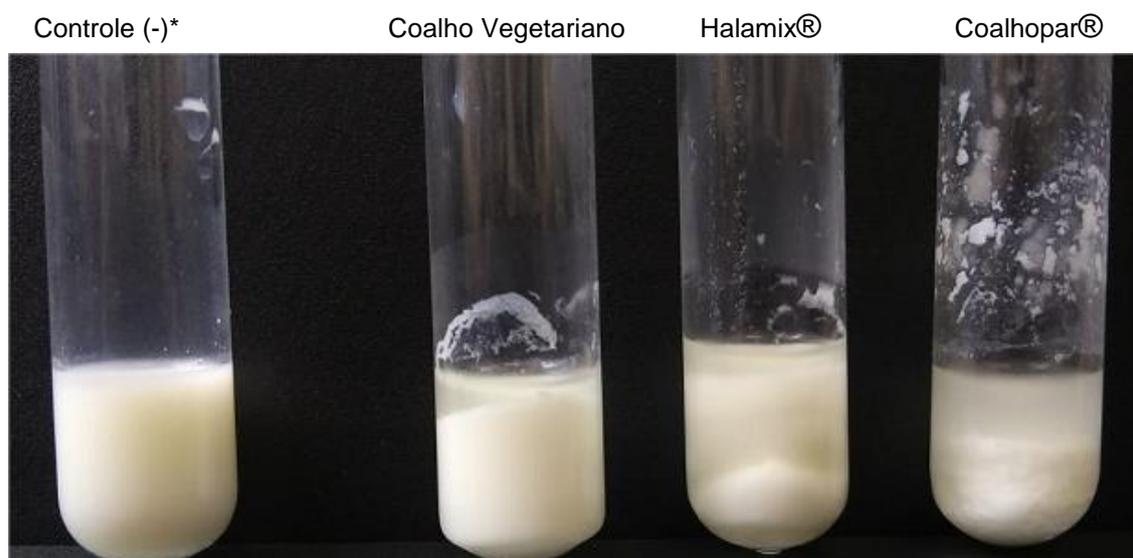
6.2 Resultados e Discussões

6.2.1 Atividade de coagulação do leite

As proteínas do látex de *C. procerca* utilizadas nesse trabalho como coagulante ou coalho na produção de queijos, foram capazes de coagular o leite de forma eficiente e semelhante aos coalhos comerciais, utilizados como controle positivo Coalhopar® (quimosina animal) e Halamix® (quimosina microbiana expressa em *Aspergillus niger*). O tempo de coagulação é fator importante para um bom coalho, proteólises mais rápidas podem gerar sabores desagradáveis aos queijos e quando acontecem muito depois da faixa aceitável de tempo, inviabilizam processos produtivos em maior escala.

A solução coagulante de coalho vegetariano 2mg/ml com adição de L-cisteína 0,1 mM, foi testada em alíquotas de 10, 15, 20, 25, 30 e 35 µl contra 2 ml de leite “in natura” incubado a 38°C (controle negativo), mesma quantidade de leite recebeu coalhos comerciais em concentrações orientadas pelos respectivos fabricantes. Após imediata adição das preparações enzimáticas de coalho de origem vegetal e coalhos comerciais, foi aferido o tempo até que os primeiros coágulos aparecessem nas paredes dos tubos (FIGURA 23).

Figura 23 – Aspecto geral na formação de coágulos no leite ao se utilizar coalho de origem vegetal e coalhos comerciais.



* Leite de vaca pasteurizado lentamente (60-65°C/20min.) + cloreto de cálcio 40%; Adicionado ao leite 30µl de solução 2mg/ml de coalho vegetariano; os demais coagulantes comerciais seguiram quantidades estabelecidas pelo fabricante; Ensaio realizado em triplicata.

Fonte: Próprio autor

Com exceção da alíquota de 10 μl (20 μg) da preparação enzimática de coalho de origem vegetal, todas as demais coagularam o leite em tempos diferentes formando coalhadas consistentes e estáveis (TABELA 13). Leite (2016) quando estudou a atividade de coagulação do leite utilizando frações proteolíticas de *C. grandiflora*, *P. rubra*, *H. drasticus*, *C. procera* e *C. papaya*, concluiu que com exceção das frações de *P. rubra* e *H. drasticus*, as demais frações são capazes coagular o leite através da hidrólise da κ -caseína.

Tabela 13 – Tempo de coagulação do coalho de origem vegetal.

Coagulante	Controle*	10 μl	15 μl	20 μl	25 μl	30 μl	35 μl
Coalho de Origem Vegetal	-	NC**	57'15"	51'26"	45'45"	38'33"	22'51"

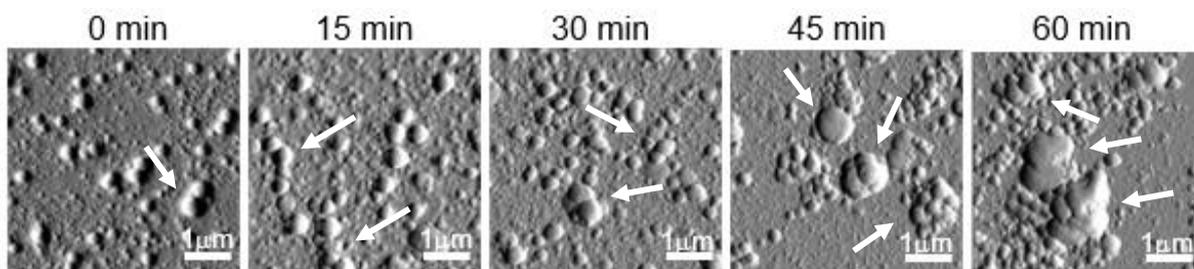
* Leite de vaca pasteurizado. ** NC: Não Coagulou; Ensaio realizado em triplicata.

As alíquotas de 25 e 30 μl (50 e 60 μg) mostraram-se capazes de coagular o leite próximo ao tempo máximo previsto no experimento (50 min), formando coalhadas consistentes e estáveis. As alíquotas de 15 e 35 μl respectivamente, formaram coágulos após o tempo previsto (57'15") e muito prematuramente (22'51").

Especialistas e produtores de queijos definem que a coagulação do leite por parte de um coagulante comercial, deve acontecer por volta de 40-50 min, abaixo desse tempo, poderão ser formadas coalhadas de menor consistência não agregando uma textura satisfatória e bom rendimento para determinados tipos de queijos. Segundo Augusto (2003), diferenças na atividade proteolítica do coagulante influenciam no rendimento de fabricação dos queijos. Coalhos com elevada atividade proteolítica como os microbianos, resultam em redução de rendimento.

Recentemente Freitas 2019, utilizou imagens de microscopia de força atômica (AFM) em estudos analíticos durante o processo de coagulação leite, induzido pela quimosina e coalho de origem vegetal ao nível da caseína micelar. O processo de agregação das micelas de caseína ocorreu de modo semelhante a quimosina, quando se usa coalho de origem vegetal, as micelas de caseína e seus agregados exibiram larguras, alturas e níveis muito próximos aos valores correspondentes da quimosina (FIGURA 24).

Figura 24 – Imagens através de Microscopia de Força Atômica (AFM) no modo de amplitude das micelas de caseína do leite após incubação com coalho de origem vegetal em diferentes tempos.



Imagens AFM em modo de amplitude. O coalho vegetariano (20 μ l, 2 mg/mL) foi dissolvido em água e adicionado a 2 ml de leite desnatado. Em seguida a amostra foi diluída com tampão Tris-HCl 50mM pH 6,5 (1:20, v/v) contendo CaCl₂ 10 mM. Os ensaios foram realizados durante 60 min. a 25°C. As setas indicam a formação de agregados e a coagulação das micelas de caseína. Adaptado de Freitas (2019).

Após a separação do soro da fração coagulada (coalhada), mecanismo denominado sinérese, realizou-se a pesagem da mesma, sendo possível assim calcular e comparar o rendimento (%) entre os coagulantes utilizados, tempo de coagulação geral e quantidade de coagulante utilizado (TABELA 14).

Tabela 14 – Dados sobre ensaio de coagulação utilizando coalho de origem vegetal e coagulantes comerciais.

Coagulante	Tempo de Coagulação* (min)	Massa obtida (mg)	Rendimento (%)	Quantidade de coagulante g/2ml leite**
Origem Vegetal	37	0,26	13	0,060
Coalhopar®	42	0,20	10	0,120
Halamix®	46	0,22	11	0,125

* Média das triplicatas dos tempos de coagulação até a formação dos primeiros coágulos.

** As quantidades dos coagulantes comerciais (Coalhopar® e Halamix®) seguiram orientação dos fabricantes.

Não foram observadas diferenças entre o tempo de coagulação do coalho de origem vegetal e os coagulantes comerciais. Maior rendimento (13%) foi observado quando utilizado o coalho de origem vegetal.

O rendimento de fabricação de queijos se refere à recuperação de gordura e proteína do leite para o queijo. Pode ser definido como a quantidade de queijo produzido a partir de um dado volume de leite (FENELON; GUINEE, 1999).

6.2.2 Poder ou força de coagulação

Conhecer o poder ou força de coagulação de uma enzima ou preparação enzimática no processo de fabricação de queijos, tem se mostrado um dado muito utilizado nos processos biotecnológicos de prospecção e estudos de novas enzimas coagulantes do leite. Os dados obtidos quanto a força de coagulação, do coalho de origem vegetal foram comparados com os dados dos coalhos comerciais para uma mesma quantidade de leite (TABELA 15).

Tabela 15 – Poder de Coagulação do coalho de origem vegetal e coagulantes comerciais.

Coagulantes	Quantidade (g)*	Poder ou força de coagulação**	Poder de coagulação informado***	Litros de leite coagulado/g coagulante****
Coalho vegetal	0,015	1:36.000	-	22,2
Coalhopar®	0,030	1:18.000	1:40.000	16,6
Halamix®	0,031	1:17.000	1:30.000	16,0

* Quantidade de coagulante orientado nos rótulos dos produtos Coalhopar® e Halamix® em 500 ml de leite adicionado 250 µl de CaCl₂ 40%.

** Poder ou força de coagulação calculado a 37 °C

*** Poder ou força de coagulação informado nos rótulos dos produtos.

**** Para os coagulantes comerciais utilizou-se os dados fornecidos nos respectivos rótulos.

Os resultados mostraram que a força de coagulação calculada para o coalho de origem vegetal, foi superior quando comparada à coalhos comerciais nas mesmas condições do experimento. O poder de coagulação obtido experimentalmente para os coalhos comerciais, não condizem com os dados informados nos rótulos dos produtos, porém deve-se levar em consideração o tempo e as condições de armazenamento dos coagulantes nos postos de venda, essas variáveis interferem em suas respectivas atividades de coagulação. Resultados

semelhantes foram obtidos por Jeronimo (2015) quando calculou o poder de coagulação do coagulante Halamix®, obtendo 1:13.333 diferente do valor informado no rótulo 1:30.000.

Outra informação importante quando se estuda coagulantes ou coalhos é o cálculo da unidade Soxhlet, definida como a quantidade de leite coagulado por 1 litro de coagulante, porém como os coalhos comerciais escolhidos e o coalho de origem vegetal estudado encontra-se na forma de pó, essa relação passa a ser de quantos litros de leite são coagulados por 1 g de coagulante, assim o coalho de origem vegetal apresentou um melhor rendimento (22 l) quando comparado aos valores indicados nos rótulos dos coagulantes Coalhopar® (16,6 l) e Halamix® (16 l).

6.3 Conclusão

O coalho de origem vegetal oriundo das proteínas do látex de *Calotropis procera*, apresentou comprovada capacidade de coagular o leite e fabricar queijos, nas mesmas condições e qualidade, que os coagulantes comerciais à base de quimosina animal ou recombinante. Torna-se inviável em termos de custo-benefício a produção de queijos, com material purificado sendo então utilizado nessa pesquisa látex total, ou seja, material liofilizado “pool” proteico, das proteínas do látex de *C. procera*.

7 ANÁLISES DO QUEIJO LACTOVEGETARIANO E LACTOSORO.

7.1 Metodologia

7.1.1 Preparação das amostras

Amostras de 10g, 25g e 50g de queijo lactovegetariano “piloto” foram intensamente maceradas em 100 ml de tampão tris HCl pH 6,5 através de almofariz, seguido de filtração em lenço de trama fina para separação da porção sólida. O filtrado foi centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido a membranas de 14 KDa, seguido de diálises contra água destilada por 48 horas com trocas sucessivas a cada 4 horas. O controle foi definido como Queijo Comercial, sendo do tipo coalho produzido e comercializado pela empresa Lá de Casa Fabricação de Derivados de Leite Ltda.

O lactosoro obtido no processo de fabricação do queijo lactovegetariano, passou por diálises nas mesmas condições anteriores em seguida liofilizado.

7.1.2 Estudo Comparativo entre os queijos Lactovegetariano (QLV) e Queijo Coalho Comercial (QCC).

7.1.2.1 Detecção de proteínas laticíferas nos queijos e lactosoro.

O estudo de detecção de proteínas no queijo lactovegetariano (QLV) e no lactosoro foi desenhado por meio do imunoensaio de ELISA utilizando anticorpos primários do tipo anti-PLCp e anti-proteaseCp (diluição 1:10.000) e secundários IgG, anti IgG de coelho, conjugado com fosfatase alcalina (diluição 1:5.000). Os experimentos foram observados em placas de 96 poços usando como substrato *p*-nitrophenil fosfato de sódio (5mg/mL). A reação foi quantificada pela absorbância a 405 nm, por meio de um leitor de ELISA (Biotrak II Plate Reader, Amersham Biosciences). O imunoensaio de ELISA foi realizado nas amostras de Coalho de Origem Vegetal (COV) como controle positivo, Lactosoro (LS), Queijo Lactovegetariano (QLV) e Queijo Coalho Comercial (QCC) como controle negativo.

7.1.2.2 Análise microbiológica dos queijos.

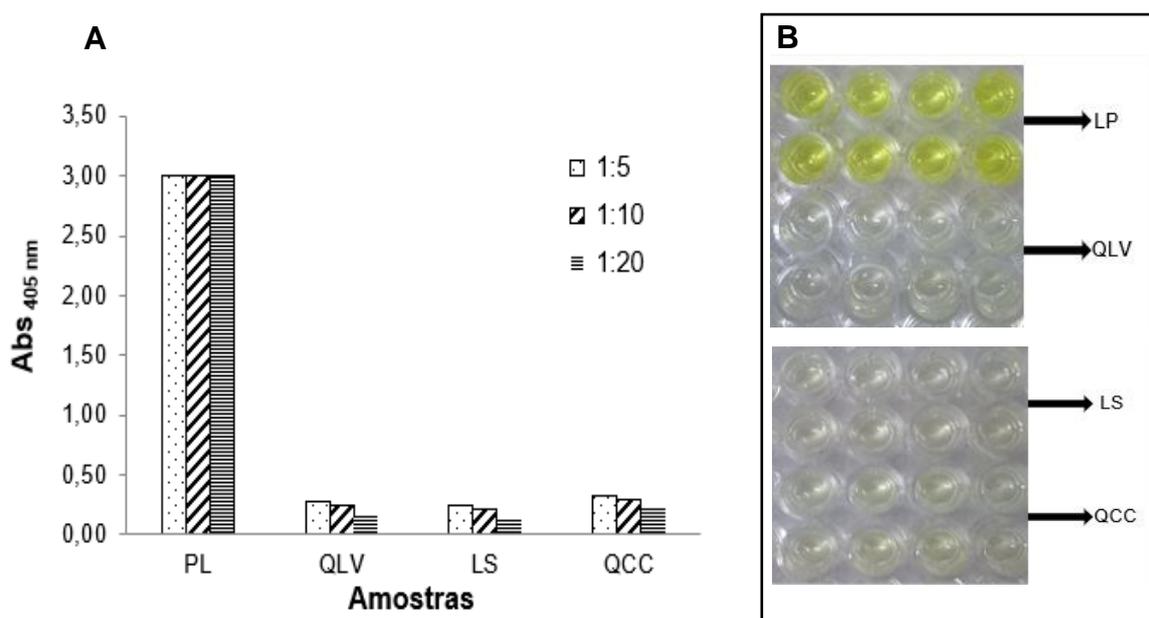
O estudo microbiológico do queijo “piloto” lactovegetariano, foi realizado no laboratório de Microbiologia de Alimentos-LMA DEAL/CCA/UFC, os ensaios seguiram mesma metodologia descrita nos ensaios anteriores.

7.2 Resultados e Discussões

7.2.1 Detecção de proteínas laticíferas nos queijos e lactosoro.

Os resultados do imunoenensaio (ELISA) utilizando os anticorpos Anti-LPCp e Anti-ProteaseCp, realizados no queijo “piloto” lactovegetariano (QLV) e coalho comercial (QCP), lactosoro (LS) extraído por dessoragem a partir do queijo lactovegetariano e nas proteínas do látex (LP) de *Calotropis procera* como controle positivo, buscam detectar a presença de proteínas residuais no queijo lactovegetariano produzido *In loco* (QLV) (FIGURA 25).

Figura 25 - Imunodeteccção (ELISA) das proteínas do látex de *C. procera* (PLCp) no queijo lactovegetariano e lactosoro, utilizando anticorpos policlonais anti-PLCp..



(A) Imunodeteccção de proteínas laticíferas de *C. procera* nos queijos lactovegetariano (QLV), queijo coalho comercial (QCC), Lactosoro (LS) e proteínas do látex (PL) como controle positivo, para diluições 1:5, 1:10 e 1:20. Queijo lactovegetariano produzido com coalho de origem vegetal a partir das proteínas do látex de *C. procera*. Queijo coalho comercial (QCC) produzido a partir de coagulante a base de quimosina animal. Lactosoro proveniente do processo de dessoragem (prensagem) do queijo lactovegetariano. Anticorpo primário 1:10.000 e anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina 1:5.000. (B) Observação nas placas das amostras de LP, QLV, LS e QCC em duplicata, usando como substrato p-nitrophenil fosfato de sódio (5mg/ml), com leitura de absorbância 405 nm.

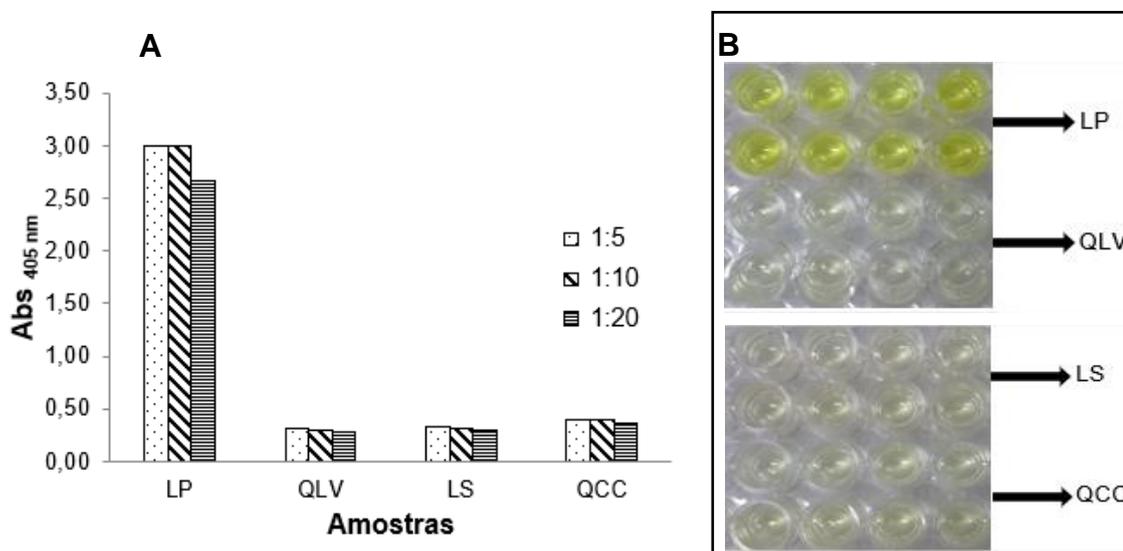
Não se observa presença significativa de proteínas do látex (PL) no queijo lactovegetariano (QLV), dado ao fato de que no processo de fabricação, quantidades mínimas e ajustadas de coalho de origem vegetal são adicionadas ao leite (30mg/litro leite), outro fator é o cozimento da massa a ± 80 °C o que poderia vir a desnaturar possíveis proteínas residuais na mistura massa-lactosoro.

Leite (2016), ao estudar queijos experimentais produzidos a partir do látex de *Calotropis procera* e *Cryptostegia grandiflora*, não detectou através do ensaio de ELISA, proteínas residuais nos queijos, justificando que tais resíduos poderiam estar solubilizados no soro eliminado. Porém nesse estudo verificou-se que mesmo no lactosoro (LS), valores insignificantes das proteínas no látex (PL) foram detectados.

A baixa detecção presente no queijo coalho comercial (QCC), mesmo utilizando coagulante a base de quimosina animal, deve-se ao fato da presença de epítomos ou sítios de ligações em comum.

Outro Imunoensaio foi realizado utilizando anticorpo primário mais específico (anti-proteaseCp) na detecção de proteases residuais nas amostras de queijo lactovegetariano “piloto” (QLV), queijo coalho comercial (QCC) e lactosoro (LS) drenado do queijo lactovegetariano. Proteínas do Látex (PL) foi usado como controle positivo (FIGURA 26).

Figura 26 - Imunodeteccção (ELISA) de proteases do látex de *C. procera* (Cp) no queijo lactovegetariano e lactosoro, utilizando anticorpos policlonais anti-proteaseCp.



(A) Imunodeteccção de proteases laticíferas de *C. procera* nos queijos lactovegetariano (QLV), queijo coalho comercial (QCC), Lactosoro (LS) e proteínas do látex (PL) como controle positivo, para diluições 1:5, 1:10 e 1:20. Queijo lactovegetariano produzido com coalho de origem vegetal a partir das proteínas do látex de *C. procera*. Queijo coalho comercial (QCC) produzido a partir de coagulante a base de quimosina animal. Lactosoro proveniente do processo de dessoragem (prensagem) do queijo lactovegetariano. Anticorpo primário 1:10.000 e anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina 1:5.000. (B) Observação nas placas das amostras de LP, QLV, LS e QCC em duplicata, usando como substrato p-nitrophenil fosfato de sódio (5mg/ml), com leitura de absorbância 405 nm.

Os resultados quando utilizado anticorpo primário anti-proteaseCp, ampliou minimamente a deteção de resíduos de proteases, em relação à deteção de proteínas quando usado anti-PLCp, haja vista sua maior especificidade às proteases presentes nos queijos lactovegetariano e lactosoro, porém ainda muito discreta. Sítios de ligação em comum (epítotos) são responsáveis pela deteção no queijo coalho comercial.

Sabendo que queijos do tipo coalho são queijos caracterizados por serem “frescos” ou seja, não exigem processos de maturação e envelhecimento, é possível que proteínas intactas residuais do leite ainda estejam presentes nos queijos de coalho. Quanto a alergenicidade às proteínas do leite possivelmente ainda presentes no queijo, Ivens et al (2017) concluiu que não se pode determinar uma correlação entre a perda de deteção de resíduos de proteínas do leite por ELISA durante o envelhecimento do queijo e a alergenicidade do queijo nessa fase de envelhecimento.

7.2.2 Análise microbiológica dos queijos.

Os resultados das análises realizadas no leite, coalho de origem vegetal (COV), queijo lactovegetariano (QLV) e queijo coalho comercial (QCC), mostraram que para todos os parâmetros microbiológicos estudados, não se verifica contaminação nem da matéria prima (leite e coalho de origem vegetal) e produto acabado (queijo lactovegetariano), queijo coalho comercial foi utilizado como controle (TABELA 16).

Tabela 16 – Análise microbiológica realizada no leite, coalho de origem vegetal, queijo lactovegetariano e queijo coalho comercial.

Análises*	Resultados				Padrões microbiológicos e sanitários para alimentos ***
	Leite**	COV	QLV	QCC	
<i>Salmonella</i> spp./25g	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Coliformes a 45°C (UFC/g)	<10,0	10 ²	<10,0	<10,0	5 x 10 ²
<i>E. Coli</i> (UFC/g)	<10,0	<10,0	<10,0	<10,0	Não Especificado

COV (coalho de origem vegetal processado a partir do látex de *Calotropis procera*), QLV (queijo lactovegetariano produzido com coalho de origem vegetal), QCC (queijo do tipo coalho comercial produzido pelo laticínio Lá de Casa).

* Amostras de 303g de queijo lactovegetariano (QLV), 370g de queijo de coalho comercial (QCC) e 100mL de leite pasteurizado, analisadas no laboratório de Microbiologia de Alimentos-LMA DEAL/CCA/UFC, laudos nº 406/2018 (ANEXO B), 639/2018 (ANEXO C), 657/2018 (ANEXO D) e 640/2018 (ANEXO E), segundo American Public Health Association (APHA)/compendium of methods for the microbiological examination of foods .

**Leite “in natura” seguido de pasteurização lenta (60-65°C/20min.) foi utilizado na produção artesanal do queijo lactovegetariano.

**Resolução – RDC Nº12, de 2 de janeiro de 2001_ Ministério da Saúde, BRASIL (2001).

Não houve a presença de *Salmonella* sp. nas amostras estudadas, a legislação brasileira recomenda a ausência de *Salmonella* sp. em alimentos para a venda e consumo. Por ser potencialmente capaz de provocar infecção de origem alimentar, a presença dessa bactéria em queijos classifica-o como produto impróprio para o consumo. Santana *et al.* (2008), ao estudar a qualidade microbiológica de queijo coalho comercializado em Aracaju, SE detectaram em 26,7% das amostras de queijo coalho analisadas a presença de *Salmonella* spp. Feitosa *et al.* (2003) também observaram *Salmonella* spp. em 9,1% das amostras de queijo produzido no Rio Grande do Norte.

Salmonella spp., bactéria responsável por casos de toxinfecções alimentares, é comumente observada em queijo-coalho, normalmente é encontrada no trato intestinal de animais domésticos e silvestres, especialmente aves e répteis e tem como principal veículo de disseminação os alimentos e a água. (Ávila e Gallo, 1996; Feitosa et al., 2003)

Coliformes termotolerantes (45°C) tiveram seus valores inferiores ao limite máximo permitido, em alimentos de acordo com a legislação vigente, apenas a amostra de coalho de origem vegetal (COV) apresentou unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) próximo do limite máximo permitido, o que não foi transferido ao queijo devido ao processo do cozimento da massa acontecer a $\pm 80^{\circ}\text{C}$, acredita-se que a limitrofe contaminação do coalho de origem vegetal tenha acontecido após seu processamento através da manipulação durante seu acondicionamento ou pesagem. Loguercio e Aleixo (2001), ao estudarem a microbiologia de queijo minas frescal produzido artesanalmente, observaram que 93,3% dos queijos-de-minas frescal artesanais, comercializados na cidade de Cuiabá, MT, estavam fora dos padrões da legislação brasileira, demonstrando que a falta de higiene na cadeia do queijo é inerente ao tipo e à região de comercialização.

Segundo a ANVISA, 2001 caso seja determinada a presença de *Escherichia coli* em análises para coliformes a 45°C, deve-se então constar no laudo analítico, assim não existe um valor mínimo preconizado para contaminação por *E.coli*, porém estudos consideram valores até 10^2 como aceitáveis, haja vista ser o limite máximo permitido para coliformes termotolerantes.

Todas as amostras analisadas dos queijos lactovegetariano (QLV), queijo coalho comercial (QCC), leite e coalho de origem vegetal (COV), apresentaram valores aceitáveis para presença de *E.coli*.

Números mais elevados de *E. coli* foram constatados em estudo realizado por Leite Júnior *et al.* (2013), quando avaliaram amostras de queijo Minas Frescal dos municípios de Barbacena, Juiz de Fora, Muriaé, Rio Pomba e Ubá, ao detectarem que 70,8% das amostras de queijo apresentam valores superiores a 10^2 NMP/g de *E. coli*.

7.3 Conclusão

O queijo de coalho lactovegetariano produzido a partir de coalho de origem vegetal oriundo das proteínas do látex de *Calotropis procera* apresenta condições microbiológicas aceitáveis para consumo quanto aos parâmetros microbiológicos preconizados pela ANVISA segundo legislação atual. Através de imunensaio verifica-se a ausência de proteases residuais no queijo lactovegetariano, isentando assim qualquer potencial alergênico por parte do coalho de origem vegetal utilizado. Efeitos alergênicos podem ser verificados, por grupos de pessoas que possam apresentar intolerância à lactose ou a outros constituintes do leite.

8 PRODUÇÃO E ANÁLISES DO QUEIJO LACTOVEGETARIANO EM PROTOCOLO INDUSTRIAL.

8.1 Metodologia

8.1.1 Produção do Queijo

A produção do queijo lactovegetariano seguiu a metodologia de produção tradicional do queijo coalho segundo Nassu, Macedo e Lima (2006), com modificações segundo protocolo de produção da empresa de laticínios.

Na indústria, a produção do queijo lactovegetariano seguiu todos os protocolos e etapas usuais de produção do queijo coalho comercial, diferenciando apenas na etapa de adição do coagulante, no caso foi o coalho de origem vegetal, obtido do látex de *Calotropis procera* em substituição ao coagulante comercial a base de quimosina animal, utilizado nessa indústria.

Inicialmente o leite na forma “in natura” chega na empresa nas primeiras horas da manhã, em caminhões transportadores que transferem o conteúdo a tanques de acepção onde se dá início ao processo de pasteurização. O leite pasteurizado é encaminhado por tubulações até a parte interna do laticínio, onde o destino final é a “Queijomatic”, de capacidade de até 5.000 litros de leite.

Foram utilizados nessa pesquisa 200 litros de leite na produção do queijo lactovegetariano, quanto já disponível na Queijomatic sofre resfriamento até 40°C onde se adicionou 100 ml de Cloreto de Cálcio 40%, com o intuito de devolver íons cálcio pedidos no processo de pasteurização.

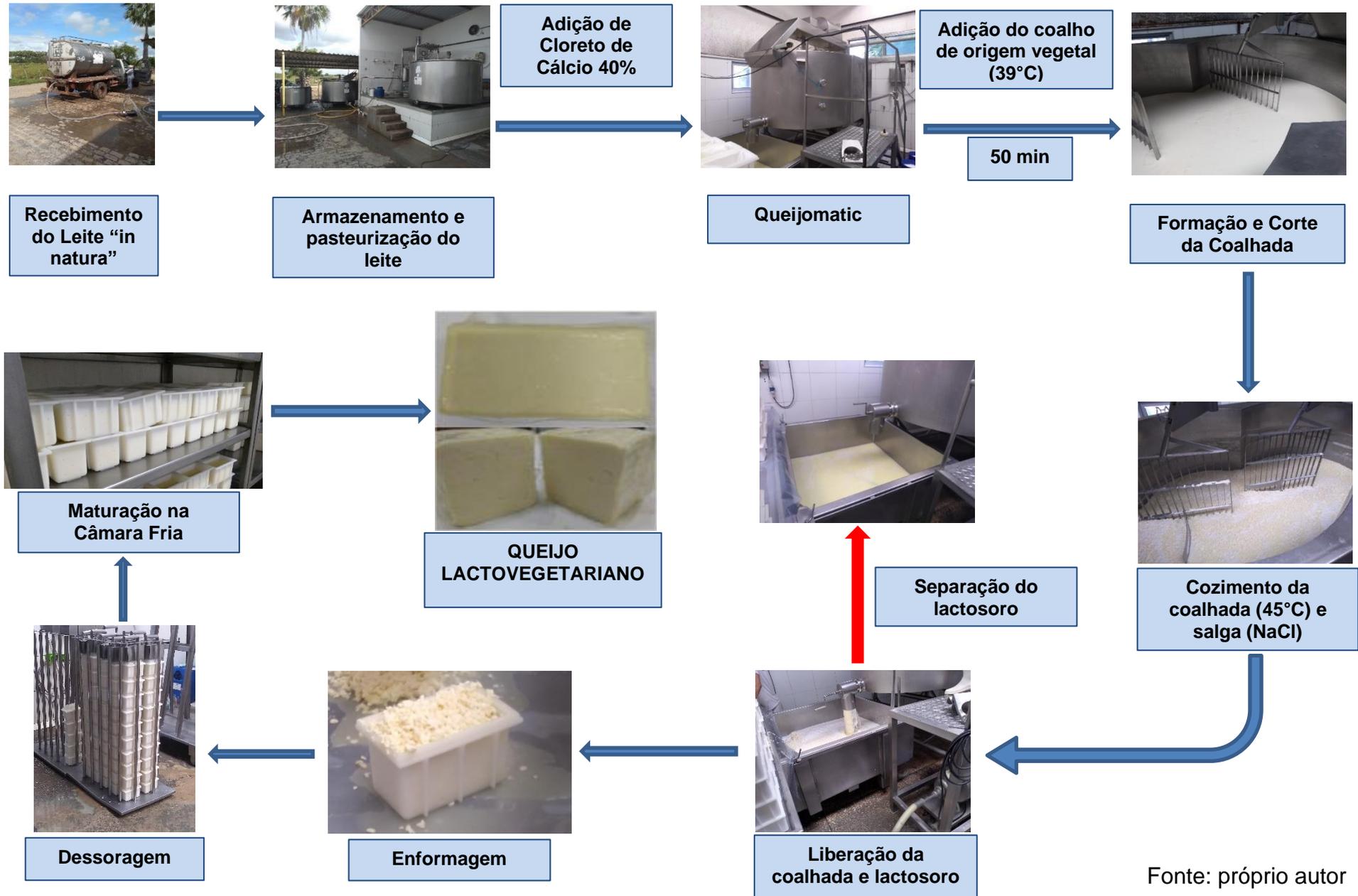
A adição do coalho vegetariano ocorreu em seguida com o leite em temperatura aproximada de 39°C, foi adicionado 6g de coalho de origem vegetal solubilizado em 100 ml de solução aquosa de L-cisteína 1mM. Após 50 minutos em repouso, ocorre a formação da coalhada lisa e consistente, sendo “cortada” transversalmente por meio de liras de aço onde se verifica o aparecimento do lactosoro, após corte a coalhada foi cozida a 45°C e adicionado 2,80 Kg de NaCl.

Após essa etapa, a mistura coalhada e lactosoro foi separada sendo a coalhada transferida a formas retangulares de capacidade aproximada de 500g ou de 1Kg, quando se inicia o processo de dessoragem (prensagem), extraíndo resquícios

de lactosoro ainda presente. Após 10 horas prensando as formas foram alocadas na câmara fria, onde permaneceram por 24 horas, após isso o queijo foi desenformado e embalado à vácuo (FIGURA 27).

Após o produto acabado e embalado, seguiu para as análises físico-químicas e bacteriológicas utilizando como controle, queijo de coalho comercial produzido no mesmo laticínio sob as mesmas condições.

Figura 27 – Produção do queijo lactovegetariano na indústria



Fonte: próprio autor

8.1.2 Análises físico químicas

Os estudos quanto às análises físico-químicas dos queijos, aconteceram em parceria com o Departamento de Engenharia de Alimentos do Instituto Federal do Rio Grande do Norte, *Campus* Pau dos Ferros (IF-RN), segundo as recomendações do Instituto Adolfo Lutz (2008), e a determinação do teor de lipídeos pela metodologia de Folch (1957).

Amostras de 500g dos queijos formulados com coalho de origem vegetal, denominado nesse ensaio de queijo lactovegetariano (QLV) e queijo coalho comercial (QCC) a base de quimosina animal, foram analisados segundo os parâmetros: atividade de água, pH, acidez, umidade, cinzas, proteínas, lipídeos, carboidratos e valor calórico, todos os ensaios foram realizados em triplicata e ao final os dados foram comparados pelo teste T não pareado ou teste de Mann-Whitney com $p < 0,05$.

Atividade de água (AW)

A atividade de água nos queijos lactovegetariano (QLV) e queijo coalho comercial (QCC) foi medida de maneira direta, através do aparelho medidor de atividade de água *AquaLab*, determinada em termos de equilíbrio de pressão de vapor de água em relação à água pura, em uma determinada temperatura (Harris, 1996).

A medida da porção de água que influencia diretamente a velocidade dessas reações é chamada de atividade de água (KAREL; LUND, 2003).

Potencial hidrogeniônico (pH) e acidez titulável

Uma porção de 5 g de cada amostra, foi adicionada de 100 ml de água destilada, seguida de homogeneização com bastão de vidro, almofariz e pistilo, e remoção da camada superficial de gordura com auxílio de uma espátula (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Na determinação da acidez titulável nos queijos, a extração do ácido láctico seguiu conforme Richardson (1985).

Umidade

Amostras de 5g dos queijos lactovegetariano (QLV) e coalho comercial (QCC), foram inicialmente desidratados por secagem direta em estufa a uma

temperatura de 105 °C. A diferença de peso das amostras antes e depois da secagem, foi determinada segundo a expressão: (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

$$\frac{100xN}{P} = \textit{Umidade ou Subst. Voláteis a 105°C por cento m/m}$$

Onde:

N = n° de gramas de umidade (perda de massa em g).

P = massa em gramas da amostra inicial.

Teor de Cinzas

Através de gravimetria, amostras de 5g dos queijos lactovegetariano e coalho comercial foram submetidas a aquecimento em mufla a 550°C por aproximadamente 6 horas até incineração, obtendo cinzas de coloração branca ou ligeiramente acinzentada. O resultado foi expresso como percentual de cinzas segundo a expressão: (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

$$\frac{100xN}{P} = \textit{Cinzas por cento m/m}$$

Onde:

N = n° de gramas de cinzas

P = massa em gramas da amostra inicial

Proteínas

A quantificação de proteínas nas amostras dos queijos lactovegetariano (QLV) e coalho comercial (QCC) foi determinada pelo método de Micro-Kjeldahl, conforme AOAC (1995). 1g das amostras foram submetidas as etapas de digestão em 10 ml de ácido sulfúrico concentrado em 2 g do meio catalítico (SeO₂+K₂SO₄+CuSO₄), a mistura foi aquecida em bloco digestor (± 450°C) até completa oxidação do carbono e hidrogênio presentes no material, evidenciada quando o tubo Kjeldahl ficou límpido e transparente com uma coloração azulada-esverdeada. A etapa seguinte à digestão, foi de destilação em destilador de nitrogênio, após lavagem das paredes do tubo com

± 10 ml de água destilada adicionou-se 10 gotas de fenolftaleína, neutralizada com solução saturada de hidróxido de sódio 40%. O destilado foi recolhido em um Erlenmeyer de 250 ml contendo 10 ml de solução de ácido bórico 5% e indicador misto (vermelho de metila + verde de bromocresol), recolheu-se aproximadamente 100 ml do destilado. A última etapa foi de titulação com ácido clorídrico 0,1N. O teor de proteína total foi obtido multiplicando-se o percentual de nitrogênio total pelo fator de conversão 6,38 utilizado para leite e seus derivados, segundo a expressão:

$$\text{Proteínas (\%)} = \frac{Vg \times FcHCl \times FcC \times 0,14}{Pa}$$

Em que:

Vg – Volume gasto da bureta.

FcHCl – Fator de Correção do HCl.

FcC – Fator de Correção do N em proteínas em leite e seus derivados (6,38).

Pa – Peso da amostra.

Lipídeos

O teor de lipídeos foi determinado pela metodologia de Folch (1957), a partir de 2g dos queijos lactovegetariano e coalho comercial, transferidos a um béquer contendo 30 ml da solução clorofórmio-metanol 2:1 em seguida macerado e filtrado em papel, o volume do filtrado foi anotado e então transferido a um proveta com adição de 20% de uma solução de sulfato de sódio 1,5%. A solução foi então agitada e deixada em repouso por 1(um) minuto até a separação de fases, anotando-se o volume da fase inferior. A fase superior foi cuidadosamente retirada por sucção com auxílio de uma pipeta e foi em seguida filtrada em papel de filtro contendo 10g de sulfato de sódio P.A., 5 ml do filtrado foi transferido para uma cápsula de alumínio, previamente seca em estufa a 105°C, resfriada em dessecador e pesada. A solução por último foi transferida para a cápsula e levada a estufa em temperatura de 105°C até total evaporação da solução, resfriada em dessecador e pesada em balança analítica. O teor de lipídios foi determinado conforme a equação:

$$\text{Lipídeos (\%)} = \frac{(PcL - Pc) \times Vif}{Pa \times 5} \times 100$$

Em que:

PcL – Peso da cápsula com lipídeos

Pc – Peso da cápsula vazia

Vif – Volume inferior medido na proveta

Pa – Peso da amostra

Carboidratos Totais

A determinação de carboidratos totais digeríveis, excluindo as fibras, nos queijos estudados, foi obtido através da fórmula:

$$\text{Carboidratos (\%)} = 100 - (\% \text{ Umidade} + \% \text{ Cinzas} + \% \text{ Lipídeos} + \% \text{ Proteínas})$$

Valor Calórico

A determinação do valor calórico foi segundo a fórmula (BRASIL, 2005),

$$\text{Valor calórico (kcal/100g)} = (\% \text{ de Lipídeos} \times 9) + (\% \text{ de Proteínas} \times 4) + (\% \text{ de Carboidratos} \times 4).$$

Análise estatística

Para a avaliação dos resultados das análises físico-químicas foi empregada o Teste T seguido de Mann Whitney/Unpaired com nível de 5 % de significância ($p < 0,05$) utilizando o programa Graphpad Prism 7.0.

8.1.3 Perfil de textura (TPA)

O estudo do perfil de textura dos queijos estudados QLV e QCC, foi realizado de acordo com Lashkari, Khosrowshahi Asl, Madadlou e Alizadeh (2014) com algumas modificações usando o analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems, Reino Unido). Uma sonda plana de 35 mm de diâmetro foi acoplada à cruzeta móvel. Amostras cilíndricas de queijo (12 x 10 mm), tiradas de uma profundidade de 5 mm no bloco de queijo a 8 °C com broca de cortiça, foram colocadas em sacos plásticos

herméticos, mantidas em geladeira a 4 °C por 4h para equilibrar e, em seguida, reserve a 21 ± 1 ° C por 45min. As amostras foram compactadas em testes de dois ciclos a uma velocidade de 1,2 mm / s com 33% de deformação a partir da altura inicial da amostra. Foram determinados parâmetros texturais como dureza, adesividade, coesão, goma, mastigação e elasticidade. Cada amostra foi analisada em triplicata). Foi empregado o Teste T seguido de Mann Whitney/Unpaired com nível de 5 % de significância ($p < 0,05$).

8.1.4 Análises Microbiológicas.

Exemplares de 500g dos queijos lactovegetariano (QLV) e coalho comercial (QCC), produzidos no laticínio segundo metodologia descrita anteriormente, devidamente embalados à vácuo e mantidos sob refrigeração, foram submetidos a testes microbiológicos, que atestassem a qualidade quanto à validade sugerida pela indústria de 30 dias. Logo após a produção, os queijos foram acondicionados em caixa térmica e encaminhados ao laboratório de microbiologia de alimentos da Universidade Federal do Ceará- LMA DEAL/CCA/UFC, seguindo a metodologia da American Public Health Association (APHA)/compendium of methods for the microbiological examination of foods (WASHINGTON, 2001).

Após 30 dias, os queijos que seguiram sob refrigeração a $\pm 8^{\circ}\text{C}$ foram também encaminhados à análises microbiológicas. O ensaio total apresentou duas vertentes, sendo a primeira a verificação de possível contaminação em algum momento do processo produtivo dos queijos e no segundo momento foi estudado um possível crescimento microbiológico, nos queijos quando armazenados por 30 dias sob refrigeração de acordo com as especificações do fabricante. Os ensaios foram para *Salmonella sp.*, *Coliformes* a 45°C e *Escherichia coli*, segundo os padrões microbiológicos sanitários para alimentos (Anvisa, 2001/RDC N° 12, de 02 de janeiro de 2001).

8.2 Resultados e Discussões

8.2.1 Produção do queijo lactovegetariano na indústria

Definiu-se queijo lactovegetariano (QLV) ao produto confeccionado a partir do uso do coagulante de origem vegetal, oriundo das proteínas do látex (PL) de *Calotropis procera* e que inicialmente, produzido em escala experimental e submetido a análises físico-químicas, teste microbiológico de armazenamento e texturais, utilizando amostras de um queijo coalho comercial (QCC) produzido no laticínio “Lá de Casa”, como controle.

Foram produzidos queijos de 500 g a partir de quantidades de leite previamente definidos nos protocolos da indústria, assim como os demais aditivos cloreto de cálcio 40% e cloreto de sódio (FIGURA 28). Coalho de origem vegetal utilizado nessa pesquisa como coagulante, seguiu as proporções desse estudo, para quantidades de leite suficientes à produção de queijo lactovegetariano de 500g (200mg/5l de leite). A proteólise aconteceu dentro do tempo máximo de 50 minutos, com formação de coalhada lisa, firme e após corte liberando lactosoro de cor levemente esverdeada, semelhante à coalhada-lactosoro da produção de queijo coalho nessa indústria, quando usa coagulantes a base de quimosina ou microbiano.

Figura 28 - Queijos de coalho lactovegetariano e comercial.



(A) Queijo de coalho lactovegetariano produzido no Laticínio Lá de Casa em forma redonda ($\pm 1,0$ Kg) e fracionado em forma padrão de comercialização retangular (± 500 g) a partir de 10l de leite/300 mg de coalho de origem vegetal. (B) Queijo de coalho comercial produzido e comercializado pela empresa Lá de Casa.

8.2.2 Análises físico-químicas

Amostras de 500 g dos queijos lactovegetariano (QLV) e queijo coalho comercial (QCC) formulado com quimosina animal, foram analisados segundo os parâmetros: atividade de água, pH, acidez, umidade, cinzas, proteínas, lipídeos, carboidratos e valor calórico (TABELA 17).

Tabela 17 - Análises físico-químicas dos queijos lactovegetariano (QLV) e queijo coalho comercial (QCC).

Parâmetros	QLV	QCC
Atividade de Água	0,90 ^a	0,90 ^a
pH	6,72 ^a ±0,02	6,43 ^a ± 0,05
Acidez (%)	0,26 ^a ±0,03	0,31 ^a ±0,01
Umidade (%)	52,43 ^a ±0,08	43,86 ^b ±0,78
Cinzas (%)	5,48 ^a ±0,06	4,11 ^b ±0,04
Proteínas (%)	21,60 ^a ± 0,22	23,16 ^a ±0,65
Lipídeos (%)	17,55 ^a ±1,67	22,07 ^a ±1,27
Carboidratos (%)	5,21 ^a ±1,71	5,49 ^a ±1,24
Valor Calórico (kcal/100g)	250,40 ^a ±17,18	320,50 ^b ±15,34

QCC: queijo coalho comercial (empresa Lá em casa); QLV: queijo lactovegetariano. Valores referentes a 100g de amostra. Valores expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam amostras diferentes pelo T Test seguido de Mann Whitney/Unpaired a 5% de probabilidade.

Os resultados encontrados para os parâmetros físico-químicos (atividade de água, pH, acidez, proteínas, lipídeos e carboidratos) das amostras de queijo lactovegetariano (QLV) e queijo coalho comercial (QCC), demonstra que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os queijos.

Para o parâmetro potencial hidrogeniônico (pH) as amostras apresentaram médias de 6,72 e 6,43 para os queijos lactovegetariano e coalho padrão respectivamente. Os valores encontrados foram semelhantes aos de outros estudos sobre queijo de coalho, Sousa *et al.* (2014) ao analisar os parâmetros físico-químicos de queijos de coalho na região nordeste, obteve média de pH 6,11 e 6,22 nos queijos analisados dos estados do Ceará e Piauí, respectivamente. De acordo com Munck (2004) valores de pH mais baixo, em torno de 5,7 são comuns em queijos que

recebem fermento em seu preparo e valores acima de 6,5 caracteriza queijos de coalho sem adição de fermento em seu fabrico.

Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram obtidas quanto a umidade entre os queijos lactovegetariano (52,43%) e coalho comercial (43,86%), classificando o queijo lactovegetariano como de alta umidade ($46\% < \text{umidade} < 55\%$) e o queijo controle (QCC) como sendo de média umidade ($39\% < \text{umidade} < 76\%$), ambas as amostras estão de acordo com os níveis de umidade estabelecidos no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho que varia de 39 a 55% (BRASIL, 2001a). Silva *et al.* (2010), observaram teores de umidade variando de 45,5 a 51,5% em queijos de coalho.

Segundo Freitas Filho *et al.* (2009), a umidade interfere na atividade de água (Aa) e nas ações metabólicas de microrganismos ao longo da maturação, com suas possíveis consequências no pH, na textura, no sabor e no aroma. Nassu *et al.* (2001) relaciona as diferenças de umidade entre queijos do tipo coalho, a fatores como a matéria prima utilizada e ao processo de fabricação, principalmente no manuseio da coalhada, interferindo em uma maior ou menor retenção de umidade e gordura.

A Atividade de água (Aa) referente aos queijos estudados, não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$), valores médios de 0,90 para ambos. Resultados semelhantes, foram observados por Andrade (2006), que obteve valores de Aa variando de $0,944 \pm 0,001$ a $0,979 \pm 0,002$. Souza *et al.* (2014) ao estudar 104 amostras de queijos de coalho da região nordeste, obteve variação de 0,911 a 0,963 de Aa. Valores elevados de atividade de água, tornam os queijos mais propícios ao elevado desenvolvimento microbiano.

A acidez percentual expressa em ácido láctico variou de 0,26 a 0,31% de ácido láctico para os queijos lactovegetariano e coalho comercial respectivamente, sem diferenças significativas entre ambos ($p < 0,05$). Souza, *et al.* (2014) ao calcular a acidez percentual de ácido láctico em queijos de coalho, obteve oscilações entre 0,16 a 0,74%. Os dados obtidos por Perez (2005), quando utilizou amostras de queijos de coalho industrializado produzidos na cidade de Campinas (SP), são similares aos queijos analisados nesse estudo, variando de 0,18 a 0,50%. A acidez oriunda da produção de ácido láctico a partir da degradação da lactose pelas bactérias, tem influência direta no pH e na expulsão de soro da massa durante a fabricação e na fase inicial da cura.

O controle de qualidade físico químico de queijos quanto aos teores de proteínas e matéria gorda (lipídeos), tem se mostrado fundamental, pois estudos mostram que teores mínimos de lipídeos por exemplo, afeta muito o sabor, o aroma e a consistência do queijo. O teor de lipídeos encontrado no queijo lactovegetariano (17,55%), foi inferior ao encontrado no queijo coalho comercial (22,07%). A maioria dos queijos coalhos comercializados apresentam teores de gordura médio de 33,0% (LIMA, et al. 2017). Os resultados obtidos para os queijos estudados (QLV e QCC) corroboram com os estudos relatados por Santos *et al.* (2011), que determinou teor de 24,0% de matéria gorda na elaboração de queijo de leite de vaca e Freitas *et al.* (2013) avaliando queijos em 3 microrregiões da Paraíba encontraram valores de 19,04 a 25,38%. Não há diferença significativa ($p < 0,05$), com relação aos teores médios de lipídeos entre os queijos lactovegetariano e coalho comercial.

Não há diferença significativa no nível de 95% de confiança, com relação aos teores médios de proteínas originados dos queijos lactovegetariano e coalho comercial. Observou-se que os queijos de coalho padrão (QCC) e lactovegetariano (QLV), apresentam em geral teores de proteína acima de 20% valor referenciado na literatura para teor de proteínas em queijos de coalho. A média do teor de proteínas corrobora com o trabalho de Correia (2011), o qual estudou o delineamento do perfil fabril e caracterização físico-química do queijo de coalho no sertão Paraibano, o mesmo encontrou valor médio de 20,14 % para queijo tipo A (queijos produzidos com leite pasteurizado) e 18,92% para queijos de coalho tipo B (queijos produzidos com leite cru). Em pesquisa de Dias e colaboradores (2013) avaliando queijo coalho no município de Cachoeirinha - Pernambuco classificou o teor de proteína de 18,87%, parâmetro abaixo da média reportada para os queijos estudados nessa pesquisa.

A legislação brasileira não estabelece padrões para os teores de proteínas, visto que ainda não existe uma padronização no processo de produção de queijo de coalho, sendo em parte produzida em pequenas queijarias de forma artesanal (Furtado, 2005).

O teor de cinzas detectado nos queijos lactovegetariano (5,48%) e coalho comercial (4,11%), encontram-se dentro das médias estabelecidas em estudos afins. Mamede, 2010 ao estudar as características sensoriais e composição química do queijo de coalho industrializado, obteve teor de cinzas em um tipo de queijo industrializado na ordem de 4,3%. Machado *et al.* (2004) e Vargas *et al.* (1998) ao

analisarem o teor de cinzas em queijos artesanais, apresentaram médias de 3,79% e 4,35 % respectivamente.

O teor de carboidratos totais, nos queijos estudados não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) e os valores foram coerentes em outros estudos de análises de carboidratos totais, realizadas em queijos do tipo coalho. Os valores de carboidratos verificados em queijos de coalho artesanais por Araújo & Nassu (2005) encontraram-se entre 1,00% e 7,00%.

O valor calórico representa a quantidade de quilocalorias por cem gramas de alimento e é determinado em função dos teores de proteínas, lipídios e glicídios. Os valores calóricos médios observados nesse estudo para os queijos lactovegetariano e coalho comercial foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) sendo o queijo lactovegetariano com menor valor calórico (250,40 Kcal/100g) em comparação ao queijo coalho comercial (320,50 Kcal/100g), porém inferiores aos encontrados por Gouvêa & Dias (2004), em estudo com queijos de coalho encontraram valores calóricos médios entre 393,90 Kcal/100g e 411,02 Kcal/100g.

8.2.3 Perfil de Textura (TPA)

A textura pode ser avaliada de muitas formas para determinar as diversas propriedades, técnicas objetivas e subjetivas de análise de textura têm sido aplicadas para avaliar a estrutura do alimento, como parte do controle de qualidade de produtos acabados e no desenvolvimento de novos produtos (SMEWING, 2000).

A avaliação da qualidade sensorial através dos métodos instrumentais é difícil, uma vez que requer procedimento capaz de imitar a mastigação do alimento. Contudo, as propriedades reológicas dos alimentos podem ser determinadas facilmente por métodos instrumentais (FOX & McSWEENEY, 2000).

O estudo do perfil textural do queijo lactovegetariano baseou-se nos parâmetros de dureza, adesividade, elasticidade, coesividade, gomusidade e mastigabilidade (TABELA 18).

Tabela 18 - Resultados das análises de perfil de textura (TPA) nos queijos lactovegetariano (QLV) e coalho comercial (QCC).

Parâmetros	QLV*	QCC**
Dureza (N)	40,68 ^a ±3.13	50,80 ^b ±3.85
Adesividade	-2.24 ^a ±0.49	-0,92 ^b ±0.33
Elasticidade	0.85 ^a ±0.01	0,82 ^a ±0.02
Coesividade	0.35 ^a ±0.02	0,51 ^b ±0.07
Gomusidade (N)	15,16 ^a ±1.55	6,52 ^b ±0.87
Mastigabilidade (N)	13,09 ^a ±1.33	19,24 ^b ±0.60

* Queijo lactovegetariano produzido em protocolo industrial utilizando coalho de origem vegetal.

** Queijo coalho comercial a base de quimosina. Empregado o Teste T seguido de Mann Whitney/Unpaired com nível de 5 % de significância ($p < 0,05$), letras diferentes na mesma linha diferem entre si estatisticamente.

As amostras apresentaram valores de dureza compreendidos entre 40,68 N para o coalho lactovegetariano e 50,80 N para o queijo comercial, apresentando entre eles diferença estatística significativa ($p < 0,05$). A dureza é o valor referente a força necessária para comprimir o alimento entre os dentes molares, desta forma, quanto maior o valor mais firme será o queijo, por sua vez, baixos valores de dureza referem-se a queijos mais macios. Andrade (2006) ao analisar queijos coalho do Ceará encontrou valores de dureza de 20,27 a 58,86 N. Fogaça (2014) encontrou valores médios de 71,22 N. Queiroga *et al.* (2013) relataram valores médio de 15,99 N. A partir dos estudos observa-se uma grande variação nos valores de dureza para queijo de coalho, essa amplitude de valores encontrados é referente principalmente a diferenças na composição desses queijos e técnicas de processamento variadas, evidenciando a falta de padrão na elaboração do queijo do tipo coalho.

Os valores referentes a mastigabilidade dos queijos lactovegetariano (13,09 N) e do queijo coalho comercial (19,24 N) apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre eles. Os resultados obtidos foram menores aos relatados nos estudos em relação ao queijo de coalho, menores valores de mastigabilidade no queijo lactovegetariano se deve a característica macia e alta umidade, se assemelhando às características dos queijos minas frescal. A mastigabilidade refere-se a energia necessária para desintegrar o alimento durante a mastigação. A mastigabilidade correlaciona-se com a dureza, uma vez que, quanto maior a dureza do queijo maior a energia necessária para desintegrá-lo. Assim como a dureza, para o parâmetro

mastigabilidade em queijo coalho também são relatados diferentes valores por diversos pesquisadores, como Amaral *et al.*, (2017) que encontraram valores em torno de 16,65, Silva (2013) relatou valores de 54,21 a 69,32 e Buzato (2011) que encontrou valores de 39,24 a 98,1. Verifica-se também alta amplitude de valores nesse parâmetro, relacionado a uma não padronização na fabricação dos queijos do tipo coalho.

Os resultados para coesividade entre as amostras variaram de 0,35 a 0,51 entre os queijos lactovegetariano e coalho comercial, respectivamente. Silva, 2017 ao caracterizar o perfil de textura dos queijos de coalho da região do vale do Jaguaribe-CE, obteve valores que entre 0,40 a 0,74 nos lotes dos queijos analisados quanto ao parâmetro coesividade. Conforme Fogaça (2014) quanto maior as interações entre seus componentes mais coeso é o queijo, apresentando maior resistência à ruptura e portanto, mais rígido.

A elasticidade apresentou valores de 0,85 a 0,82 entre os queijos, e refere-se à recuperação após a retirada da força de compressão. Os valores encontrados tanto para o queijo lactovegetariano quanto coalho comercial, foram altos, desta forma o queijo coalho apresenta capacidade de retornar à sua altura original, após ser submetida a uma certa tensão. Por não apresentar diferença estatística entre as amostras ($p < 0,05$), não é possível observar influência dos demais parâmetros na elasticidade dos queijos coalho analisados. Os resultados corroboram com os observados por Silva (2013) que encontrou valores médios de 0,87 e Amaral *et al.* (2017) que obtiveram valor médio de 0,85.

Valores de Gomusidade entre os queijos estudados, apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$), sendo o queijo lactovegetariano (15,16 N) com valor significativamente superior ao queijo comercial (6,52 N), ambos estão acima dos valores descritos em alguns estudos que observam amplitude de 1,68 a 4,88 (BURITI, 2008).

8.2.4 Análises Microbiológicas

O Regulamento da Diretoria Colegiada RDC 12 de 02/01/2001 da ANVISA, estabelece os padrões microbiológicos para alimentos, considerando para o queijo coalho NMP/g (número mais provável por grama) uma tolerância de 5×10^2 para

coliformes termotolerantes e ausência de *Salmonella* sp., não especificando valores para *E.coli*.

A amostra analisada de queijo lactovegetariano produzido na indústria, apresentou os mesmos valores quanto aos parâmetros microbiológicos estudados, em relação ao queijo lactovegetariano “piloto” produzido de forma artesanal, ou seja, de acordo com os limites máximos permitidos pela legislação vigente (TABELA 17). Não se observou contaminação temporal entre as amostras de queijo lactovegetariano e coalho comercial, quando se analisou imediatamente após serem embalados e após 30 dias de armazenamento sob refrigeração a 8°C.

8.3 Conclusões

O apelo biotecnológico dessa pesquisa, advém da produção final de um queijo lactovegetariano, apresentando qualidade e características próprias quanto à parâmetros físico-químicos e texturais. Após ser produzido e armazenado, mesmo após 30 dias, mantém qualidade microbiológica e validade de acordo com a legislação específica.

9 ANÁLISE SENSORIAL DO QUEIJO LACTOVEGETARIANO PRODUZIDO COM COALHO DE ORIGEM VEGETAL

9.1 Metodologia

9.1.1 Análise Sensorial do queijo lactovegetariano

A análise sensorial é um método científico para medir as respostas humanas aos estímulos externos. Os testes são realizados através de procedimentos específicos que foram estabelecidos com base em observações científicas do comportamento humano. Os resultados podem ser objetivos ou subjetivos, dependendo da finalidade específica e procedimento sensorial selecionado (FOEGEDING; DRAK, 2007).

Os testes sensoriais realizados após aprovação nos comitês de ética da Universidade Federal do Ceará (UFC) onde a pesquisa foi desenvolvida e do Instituto Federal do Ceará (IFCE) Campus Baturité, instituição proponente e onde se realizou as análises sensoriais, contaram com a participação de 109 provadores que inicialmente responderam questionário de recrutamento constando dados sobre a faixa etária, nível de escolaridade, grau de gosto ou desgosto de queijos, frequência e formas de consumo de queijo (APÊNDICE A).

Comitê de ética

Diante da exigência ética referente às pesquisas que envolvam humanos, a etapa da análise sensorial do queijo lactovegetariano foi cadastrada na Plataforma Brasil no formato de projeto, indicando o Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (CEP/UFC) como responsável pela análise e julgamento do projeto, haja vista o vínculo dos pesquisadores com essa universidade.

Somente após aprovação no comitê de ética supra, foi solicitado que o projeto fosse também apreciado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto Federal do Ceará CEP/IFCE, exigência essa devido ao fato de que essa seria a instituição proponente, onde se realizou os testes sensoriais do queijo lactovegetariano. A escolha de uma instituição proponente justificou-se pela presença de uma das colaboradoras desse projeto, ser uma professora do curso de engenharia de alimentos e gastronomia dessa instituição de ensino superior, e conseqüentemente o perfil de

alunos e corpo docente desses cursos que se apresentaram como provadores nos testes sensoriais, promoveram uma maior robustez nas análises dos parâmetros testados.

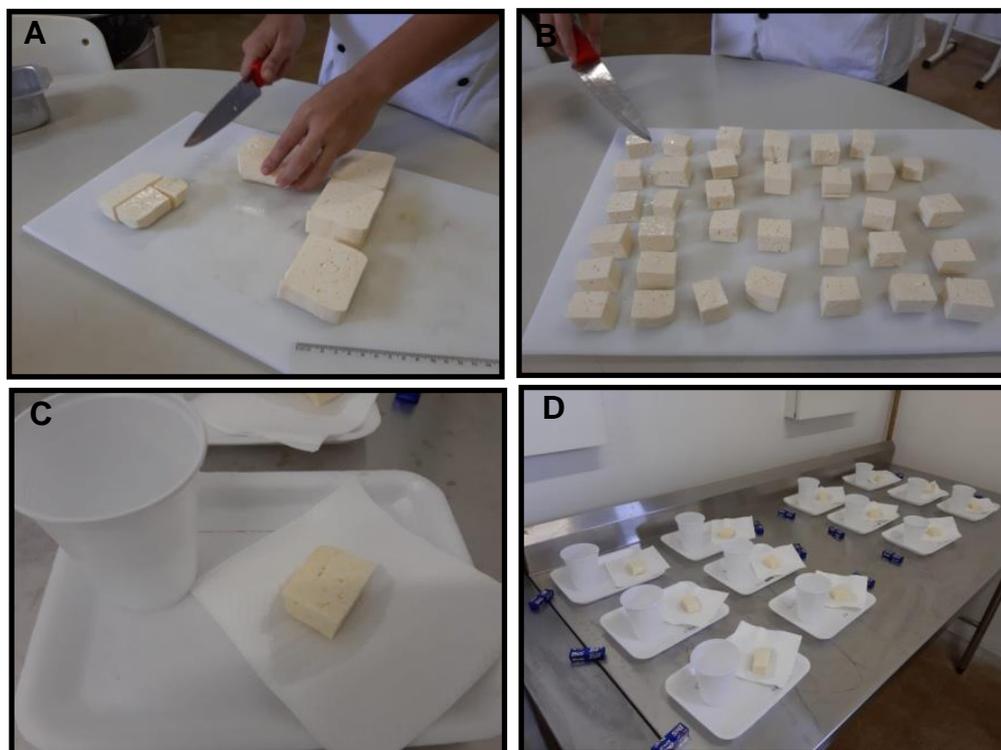
9.1.2 Caracterização dos Provadores

O processo de caracterização dos provadores, participantes da análise sensorial do queijo lactovegetarino, deu início através do processo de recrutamento através de cartazes e informes que foram fixados e distribuídos entre professores, alunos e funcionários do IFCE *Campus* Baturité, orientando sobre a data, horário e o produto que seria testado, no caso o queijo lactovegetariano.

9.1.3 Preparação das Amostras

Mantido sob refrigeração, o queijo lactovegetariano foi retirado da geladeira do laboratório de análise sensorial, uma hora antes do início da degustação por parte dos provadores. Inicialmente houve o fracionamento do queijo em cubos de 1,5 cm de aresta pesando cerca de 10g, servidos em bandejas de isopor e acompanhados de água mineral, para a lavagem do palato (FIGURA 29).

Figura 29 – Preparação e apresentação das amostras aos provadores na análise sensorial do queijo lactovegetariano.



Sequência de apresentação do produto: em (A) o queijo lactovegetariano é fracionado, em (B) cubos de 1,5cm de aresta com aproximadamente 10g são transferidos a bandejas, em (C) e (D) kits que foram oferecidos nas cabines para a análise sensorial do queijo lactovegetariano.

Fonte: Próprio autor.

9.1.4 Teste de Aceitação

A análise sensorial do queijo formulado com coalho de origem vegetal, denominado nessa pesquisa de queijo lactovegetariano ocorreu em 05/2019 no Laboratório de Análise Sensorial do Instituto Federal do Ceará, campus Baturité, em cabines individuais, sob condições de iluminação, ruídos e temperatura controlados, as amostras foram avaliadas por 109 provadores. Os testes seguiram um delineamento de blocos completos, balanceados com relação à ordem de apresentação das amostras (FIGURA 30).

Figura 30 – Análise sensorial do queijo lactovegetariano.



Análise sensorial realizada no queijo lactovegetariano: Em (A) e (B) conjunto de cabines e cabine individual, respectivamente, (C) a entrega das amostras de queijo aos provadores nas cabines. e em (D) provador avaliando o queijo lactovegetariano.

Antes do encaminhamento dos provadores às cabines, os mesmos receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) documento obrigatório em análises sensoriais de alimentos, que foi lido pelos provadores, informado dados pessoais e por último assinado (ANEXO F).

Juntamente com a amostra de queijo para análise sensorial, os provadores receberam nas cabines, um instrumental na forma de questionário contendo os parâmetros: cor, aparência, aroma, textura e sabor, com uma escala hedônica variando entre 1 (desgostei extremamente) a 9 (gostei muitíssimo), e intenção de compra, com notas de 1 (certamente não compraria o produto) a 5 (certamente compraria o produto) (APÊNDICE B).

9.1.5 Cálculo do Índice de Aceitação (IA).

Ao final da análise sensorial com 109 participantes, os questionários de aceitação foram organizados, tabulados em planilhas utilizando o Microsoft Excel 2019 e assim calculado o índice de Aceitação de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de Aceitação (IA)} = \frac{A \times 100}{B}$$

Onde:

A= nota média obtida para a amostra em um determinado atributo.

B= nota máxima dada proferida a amostra naquele atributo. Valores iguais ou superiores a 70% indicam boa aceitação do produto (DUTCOSKY, 2007).

GraphPad Prism 7 foi utilizado na plotagem dos gráficos e análises estatísticas.

9.2 Resultados e Discussões

9.2.1 Perfil dos provadores

Sexo

O perfil dos provadores quanto ao sexo foi majoritário em relação ao sexo feminino (67,89%) em relação aos provadores do sexo masculino (32,11%)

Faixa Etária

A maioria dos provadores (87,15%) consistiam de jovens e adultos entre 18 e 30 anos de idade, 10,09% adultos entre 31-50 anos e minoria de provadores tinha idade entre 51-60 anos (2,76%)

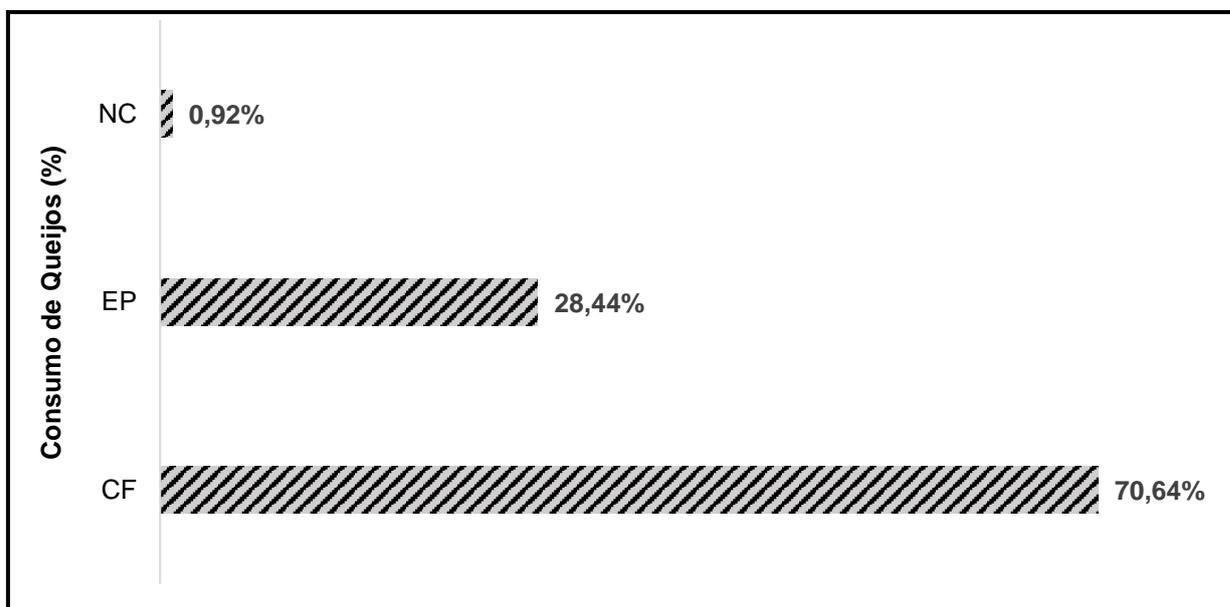
A grande diferença de provadores de 18 a 30 anos em relação aos demais, deveu-se ao fato de que a análise sensorial ter acontecido em um *campus* universitário, com alunos de graduação principalmente do curso de gastronomia, outros representantes de faixas etárias superiores, eram de professores e funcionários que representam uma minoria em relação aos discentes.

Hábito em consumir queijos

A frequência no consumo de queijos no Brasil, sofre interferência do fator sócio econômico, pois trata-se de um produto que mesmo sendo facilmente encontrado e muitas vezes de produção local, agrega um valor considerável em relação à cesta básica da população, de forma que o hábito de não consumir queijos muitas vezes, não é por opção alimentar e sim por limitação financeira.

Em relação à frequência de consumo de queijos observa-se que os provadores são consumidores frequentes, pois, 70,64% disseram consumir queijo com frequência (CF), 28,44% consomem de forma esporádica (EP), e apenas 0,92% não tem o hábito de consumir queijo (NC) (FIGURA 31).

Figura 31 – Frequência de consumo de queijo dos provadores da análise sensorial.



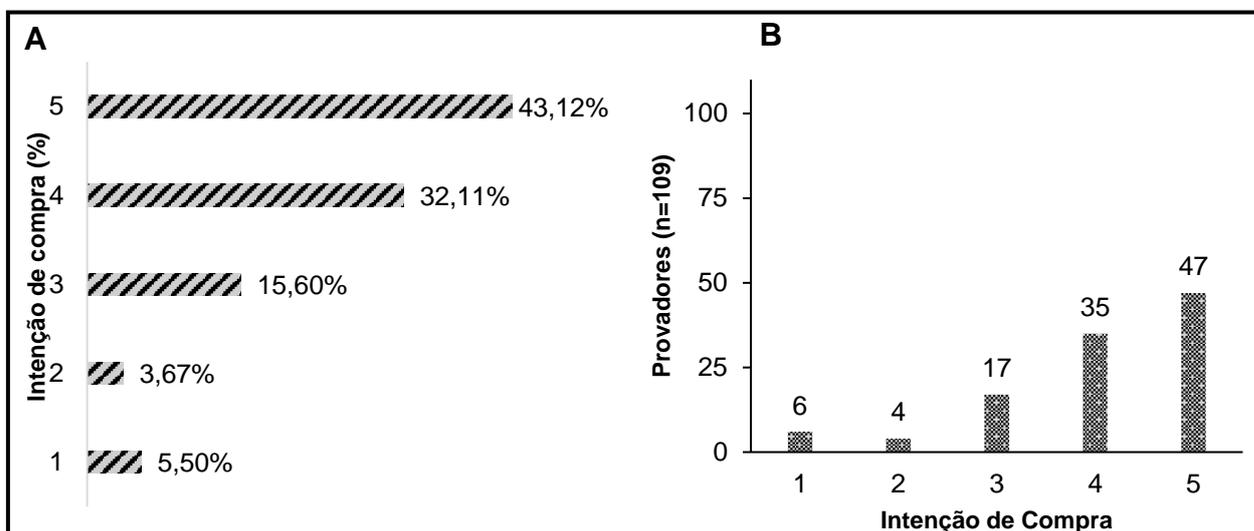
CF – Com frequência; EP-Esporadicamente; NC-Não consome queijo; n= 109 participantes.

O consumo de queijos pela população brasileira vem aumentando nos últimos anos devido ao aumento do poder aquisitivo. O país atualmente é o sexto maior produtor no mundo e consome 5,4 kg de queijo per capita no ano (ABIQ, 2017).

9.2.1.1 Intenção de compra e teste de aceitação

Após degustação do queijo lactovegetariano pelos 109 provadores, o mesmo foi inicialmente avaliado quanto a intenção de compra do produto, onde 43,12% dos provadores afirmaram que “certamente compraria esse produto”, 32,11% afirmaram que “eu provavelmente compraria esse produto” 15,60% concluíram que “tenho dúvidas se compraria ou não esse produto” e apenas 3,67% afirmaram que “certamente não compraria este produto” (FIGURA 32A).

Figura 32 – Intenção de compra dos provadores em relação ao queijo lactovegetariano.



A- Percentual de intenção de compra; B- Número de provadores por parametro de intenção de compra; 1 – Certamente não compraria esse produto; 2- Eu provavelmente não compraria este produto; 3-tenho dúvidas se compraria ou não este produto; 4-Eu provavelmente compraria este produto;5-Eu certamente compraria este produto.

No universo n=109 provadores, verifica-se que próximo à metade da amostra (47), apontam o interesse absoluto na compra do queijo lactovegetariano e apenas 6 provadores, indicam o não interesse na compra do produto queijo lactovegetariano. (FIGURA 32B)

Ainda nas cabines os provadores responderam no mesmo questionário, dados sobre os atributos sensoriais verificados ao degustarem o queijo lactovegetariano, seguindo uma escala de hedônica de 1 a 9 em relação à cor, aparência, aroma, textura e sabor (TABELA 19).

Tabela 19 – Médias de aceitação atribuídas para a amostra de queijo lactovegetariano em relação aos atributos cor, aparência, aroma, textura, sabor e impressão global.

Atributos Sensoriais					
Cor	Aparência	Aroma	Textura	Sabor	Impressão Global
8,46±0,740	8,46±0,727	7,63±1,379	7,93±1,136	7,62±1,580	8,02±1,186

Escala hedônica variando entre 1- desgostei muitíssimo; 2-desgostei muito; 3-desgostei moderadamente;4-desgostei ligeitamente;5-nem gostei/nem desgostei;6-gostei ligeiramente;7-gostei moderadamente; 8-gostei muito; 9-gostei muitíssimo. Média ± desvio padrão.

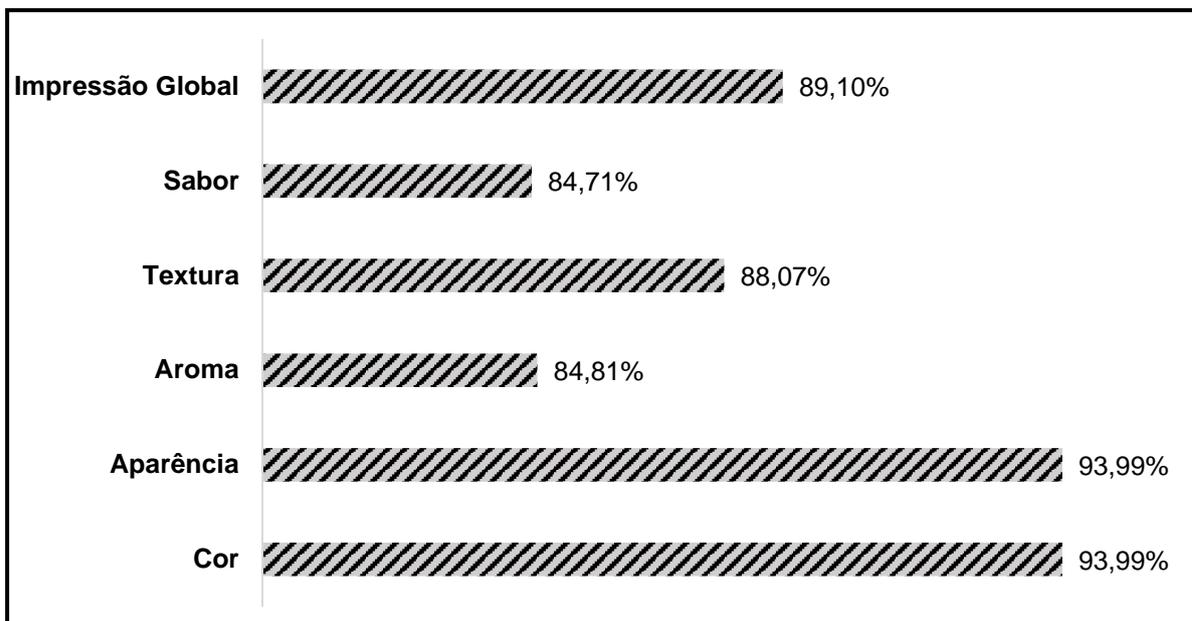
Na análise sensorial do queijo lactovegetariano, a menor média (7,62±1,580) foi para o atributo sabor e maior média foi observada no atributo cor (8,46 ±0,740).

Observou-se que para todos os atributos, o conceito médio variou de “gostei moderadamente” a “gostei muito” sendo que a impressão global do queijo lactovegetariano segundo os provadores foi de “gostei muito”. Vidal, 2011 quando realizou um diagnóstico regional do processo de queijo coalho comercializado em Nata/RN, obteve na análise sensorial de quatro amostras de queijos, sendo duas artesanais e outras duas marcas industriais, nota média mínima de 5,97 para o atributo odor e nota máxima 7,05 quanto ao sabor, sendo média geral para todos os queijos de coalho analisados de ± 6,50.

9.2.1.2 Índice de Aceitação (IA)

Os valores para os índices de aceitação são mostrados na Figura 35, em todos os atributos os valores obtidos foram bem superiores ao requerido por DUTCOSKY (2007) e MONTEIRO (1984), os quais estabelecem índice mínimo de 70% para que o produto seja caracterizado como de boa repercussão, isto posto, dá-se recomendável a produção. De forma geral o queijo lactovegetariano apresentou índices superiores a 80,0% em todos os atributos avaliados (FIGURA 33).

Figura 33 – Índice de aceitabilidade (IA) obtido na análise sensorial do queijo lactovegetariano.



Índice de aceitação (IA) calculado pela expressão: $IA = A \times 100 / B$; onde A= nota média obtida para a amostra em um determinado atributo e B= nota máxima dada a amostra naquele atributo. Valores iguais ou superiores a 70% indicam boa aceitação do produto (DUTCOSKY, 2007).

Menores valores quanto ao índice de aceitação nos quesitos sabor (84,71%) e aroma (84,81%) em relação aos demais quesitos, são comuns em queijos denominados “especiais”, pois muitas vezes o provador cria um referencial de queijo para ele mais comumente consumido, no caso em questão o queijo de coalho tradicional, que ainda assim não apresenta um padrão quanto aos atributos sensoriais estudados.

ARAÚJO (2011) ao estudar a aceitabilidade de queijos coalho considerou aceito o produto que alcançar no mínimo 70%, demonstrando assim que o queijo lactovegetariano avaliado possui índice de aceitação entre 84,71 e 93,99%. Rodrigues *et al.*, 2018 em seu estudo, avaliação sensorial e intenção de compra de queijo minas frescal trufado com goiabada, obteve índice de aceitação (IA) entre 75,59 a 83,24%.

A análise sensorial é um método científico para medir as respostas humanas aos estímulos externos. Os testes são realizados através de procedimentos específicos que foram estabelecidos com base em observações científicas do comportamento humano. Os resultados podem ser objetivos ou subjetivos, dependendo da finalidade específica e procedimento sensorial selecionado (FOEGEDING; DRAK, 2007).

9.3 Conclusão

A análise sensorial realizada no queijo lactovegetariano, apresentou resultados satisfatórios em relação a todos os atributos testados, as médias foram equivalentes e muitas vezes superiores, a outros estudos sensoriais de queijos do tipo coalho no Brasil. O índice de aceitação (IA) do queijo lactovegetariano, foi superior a 80% em todos os atributos sensoriais, dessa forma mostra ser um produto promissor e que pode facilmente ganhar mercado no mix dos denominados queijos especiais.

Observou-se nos estudos referentes à produção de queijos do tipo coalho principalmente na região do Nordeste, que não existe um padrão na sua fabricação/manipulação, o que segundo muitos autores, dificulta estudos quanto a reologia, dados físico químicos e sensoriais destes queijos.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Após as etapas de padronização e validação tecnológica do coalho de origem vegetal como coagulante na fabricação do queijo lactovegetariano, observa-se a importância futura de certificar o coalho de origem vegetal, como uma preparação enzimática e assim sua inserção, no rol das enzimas vegetais do tipo coagulase descritas através das RDC's 53 e 54/2014.

Através desse estudo que demonstrou a discreta variabilidade na qualidade de uma planta de *Calotropis procera* em situações geomorfológicas distintas, permite concluir a viabilidade na cultura dessa espécie em situação de controle experimental, com o intuito de suprir quantidades maiores de látex e assim maior estoque de coalho de origem vegetal, visando um escalonamento industrial na produção de queijo lactovegetariano.

11 OUTRAS CONTRIBUIÇÕES

Food Chemistry 307 (2020) 125574

Contents lists available at [ScienceDirect](#)



Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Biotechnological potential of a cysteine protease (CpCP3) from *Calotropis procera* latex for cheesemaking



Maria Z.R. Silva^a, João P.B. Oliveira^a, Márcio V. Ramos^a, Davi F. Farias^b, Chayenne A. de Sá^b, Juliana A.C. Ribeiro^d, Ayrles F.B. Silva^a, Jeanlex S. de Sousa^c, Rafael A. Zambelli^d, Ana C. da Silva^d, Gilvan P. Furtado^e, Thalles B. Grangeiro^f, Mirele S. Vasconcelos^g, Sandro R. Silveira^d, Cleverson D.T. Freitas^{a,*}

Artigo Publicado Qualis A1, Fator de Impacto 5,399.



PROCESS BIOCHEMISTRY

ELSEVIER

PKBI_2020_12b | Full Length Article

A standard protocol for obtaining a unique and efficient enzymatic source for cheese making and hide dehairing

Marcio Ramos | Federal University of Ceara, Campus do Pici, Bloco 907, Brazil.

Status: Under Review (3 days) | Submitted: 29/Jan/2020

[PDF](#) [Zip File](#)

[Overview](#)

Other Authors [Show Details](#)

Sandro Rios (Universidade Federal do Ceará), Raphael Coelho (Universidade Federal do Ceará), Brandon Sousa (Universidade Federal do Ceará), Jefferson Oliveira (Univ. Federal do Delta do Parnaíba), Laura Lopez (Centro de Investigación y Tecnología del Cuero), Pedro Júnior (Universidade Federal do Ceará), Diego Souza (Universidade Federal do Ceará), CLEVERSON DINIZ (Universidade Federal do Ceará)

Artigo em revisão Qualis A4, Fator de Impacto 2,883.



Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP

EDITAL Nº 05/2016 - FUNCAP – INOVAFIT 2016

PROPOSTA DE CHAMADA – FASE 2

RESULTADO FINAL



EMPRESA	PROPONENTE	PROJETO
LA DE CASA FABRICAÇÃO DE DERMADOS DE LEITE LTDA	MARTA ROCHELE SARAINA CHAGAS PINHEIRO	PRODUÇÃO DE QUEIJO VEGETARIANO

Edital Inovafit Fase II

REFERÊNCIAS

Abiq: mercado de queijos tem alto potencial de crescimento no Brasil.

Milkpoint, São Paulo, 29 maio 2017. Disponível em:

<https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/abiq-mercado-de-queijos-tem-alto-potencial-de-crescimento-no-brasil-105515n.aspx>. Acesso em: 17 Jan. 2019.

AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology and evolution plant defense against herbivory. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, USA, v. 40: p. 311-331, 2009.

AHMED, I. A. M; BABIKER, E.E. pH stability and influence of salts on activity of a milkclotting enzyme from *Solanum dubium* seeds and its enzymatic action on bovine caseins. **LWT Food Sci. Technol.**, [S.l.], V. 43, p.759-764. 2010.

ALENCAR, N. M. N.; OLIVEIRA, J. S.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; VALE, M. R.; ETCHELLS, J. P.; FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V. Pro- and anti-inflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflammation Research**, [S.l.], v. 55, p. 559–564, 2006.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS – A. A. C. C. **Approved methods of American Association of Cereal Chemists**, [S.l.], 9ed. St. Paul: 1995.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, Washington, 4.ed. ,676p.,2001.

ANDRADE, A.A. **Estudo do perfil sensorial, físico-químico e aceitação de queijo de Coalho produzido no estado do Ceará**. 2006. 138 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

ANUSHA R.; SINGH, M. K.; BINDHU O. S. Characterisation of potential milk coagulants from *Calotropis gigantean* plant parts and their hydrolytic pattern of bovine casein. **European Food Research Technology**, Germany, V. 238, p. 997-1006. 2014.

AMARAL, J. B. S.; CASSIMIRO NETO, J.; MELO, B. D. N.; SILVA, F. J. P.; MORAIS, S. M.; BRAGA, A. L. M. Textura de queijo de coalho impregnado de aromas de vinho. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, Paraná, v. 7, n. 1, p.59-63, 2017.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**, USA, 18a ed, 3ª Revisão, Washington, 2010. 1094p.

AOAC. Official methods of analysis of AOAC international. (20th ed.), **Association of Official Analysis Chemists International**, USA, (2016).

ARAÚJO, E.S. Proteases do látex de *Calotropis procera*: purificação, caracterização bioquímica, enzimática e molecular e atividades biológicas. **Tese (Doutorado em Bioquímica Vegetal) Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2013.

ARAÚJO, J. B. C. PIMENTEL, J. C. M.; NETO, A. G. V.; MATTOS, A. L. A.; PESSOA P. F. Adoção de tecnologia para melhoria do processo de produção de queijo de coalho artesanal de agricultores familiares dos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte. **XXXI Encontro nacional de Engenharia de Produção**, Belo Horizonte, 2011.

ARAÚJO, W.S. Estudo da variabilidade hidrometeorológica no nordeste do Brasil utilizando análise multivariada e spectral. **Tese (Doutorado em Meteorologia) - UFCG Departamento de Ciências Atmosféricas - Universidade Federal de Campina Grande**, Campina Grande, 2013.

ARAÚJO, R.S; NASSU, R.T. Caracterização físico-química de queijo manteiga, queijo de coalho e manteiga da terra, produzidos nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.97, p.70-75, 2005.

ARIMA, K.; Yu, J.; IWASAKI, S. [30] Milk-clotting enzyme from *Mucorpusillus* var. Lindt. **Method. Enzymol.**, USA, v. 19 p. 446-59, 1970.

ASAKURA, T.; WATANABE, H.; ABE, K.; ARAI, S. Oryzasin as an aspartic proteinase occurring in rice seeds: purification, characterization and application to milk clotting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, USA, v. 45, p. 1070-1075, 1997.

BADGUJAR, S. B., & MAHAJAN, R. T. Nivulian-II a new milk clotting cysteine protease of *Euphorbia nivulia* latex. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.I.], 70, 391–398, 2014.

ARRETT, A. J. Classification of peptidases. **Methods in Enzymology**, USA, 244: 1-15, 1994.

BERNAYS, E. A.; CHAPMAN, R. F. Host-plant selection by phytophagous insects. **Chapman & Hall**, New York, 1994.

BOYCE, A.; WALSH, G. Identification of fungal proteases potentially suitable for environmentally friendly cleaning-in-place in the dairy industry. **Chemosphere**, USA, v. 6. p. 211-8, 2012.

BRAGA, A.V.U. Caracterização de atividade de água e cinética de desorção de água em alimentos. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos**, Campinas-SP, 2015.

BRASIL. Ministério da Educação. Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Portaria nº 206, de 4 de setembro de 2018. Diário Oficial da União, Brasília, nº 172, 5 set. 2018. Seção 1, p. 22. Disponível em: <http://www.imprensa nacional.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/39729251/do1-2018-09-05-portaria-n-206-de-4-de-setembro-de-2018-39729135>. Acesso em: 19 out. 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. **Diário oficial da União**. Brasília, 16 de julho de 2001a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. **Rotulagem nutricional obrigatória: manual de orientação às indústrias de Alimentos**. 2º Versão. Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 62 de 29 de dezembro de 2011. Dispõe sobre regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte do leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, 30 dez., 2011.

BRASIL. Instrução Normativa n. 30 de 26 de junho de 2001. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos queijos de coalho, Brasília, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dispõe sobre a lista de enzimas, aditivos alimentares e veículos autorizados em preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral. **RDC Nº 53/2014**, Brasília, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre enzimas e preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral. **RDC Nº 54/2014**, Brasília, 2014.

BRUNO, M. A.; LAZZA, C. M.; ERRASTI, M. E.; LÓPEZ, L. M. I.; CAFFINI, N. O.; PARDO, M. F. Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. **LWT - Food Science and Technology**, [S.l.], v. 43, p. 695–701, 2010.

BRUTTI, C. B.; PARDO M. F.; CAFFINI, N. O.; NATALUCCI, C. L. *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. **LWT Food Science & Technology**, [S.l.], v. 45, p. 172-179, 2012.

BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R.; SAAD, S.M.I. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 1, jan./mar., 2008.

BUZATO, R. M. P. Influência da relação caseína/gordura do Leite e da temperatura de cozimento da massa no rendimento de fabricação e nas propriedades físico-químicas, funcionais e sensoriais do queijo de coalho. 271 f. **Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, 2011.

CARVALHO, J. G. Avaliação da qualidade de queijos tipo minas frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas – SP. **Dissertação (mestrado em engenharia de alimentos) Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, SP: [s.n.], 2003.

CORREIA, L.J. H. Diagnóstico das condições ambientais e avaliação dos riscos microbiológicos no processamento de queijo de coalho. **(Tese de doutorado). Universidade Federal de Campina Grande**, Campina Grande, 2011.

COSTA, A. S. Avaliação da estabilidade e da toxicidade pré-clínica de uma proteína isolada de noni (*Morinda citrifolia* L.), como etapas preliminares para seu uso terapêutico em humanos. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica Vegetal) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2016.

CHAUDHARY, S.A.; AL-JOWAID, A.A. Vegetation of the Kingdom of Saudi Arabia. **Ministry of Agriculture e Water**, Saudi Arabia, 689p., 1999.

CHEN, X.L., SHUN, C.Y., ZHANG, Y. Z., & GAO, P.J. Rapid monitoring of autolysis process of proteases by capillary electrophoresis. **Biotechnology Letters**, England, 25, 1763 –1767, 2013.

CHOU K.C.; CAI, Y.D. Prediction of protease types in a hybridization space. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Germany, v. 339 (3). p. 1015-1020, 2006.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles-Review and possible improvements. **Soft Matter**, England, v. 7, p. 2265–2272, 2010

DIAS, J. A. Qualidade físico-química, higiênico-sanitária e composicional do leite cru: indicadores e aplicações práticas da Instrução Normativa 62. **Embrapa**, Rondônia, 2014.

DIAS, G.M.P; SILVA, M. F.; MARQUES, D. de A. V.; SOARES, M. T. C. V., & PORTO, A. F. L. Avaliação da qualidade físico-química do queijo de Coalho de cachoeirinha – Pernambuco. **XIII Jornada De Ensino, Pesquisa e Extensão – Jepex 2013 – UFRPE: Recife**, 2013.

DOMSALLA, A.; MELZIG, M. Occurrence and properties of proteases in plant latices. **Planta Medica**, Germany, 74: 699-711, 2008.

DUSSOURD, D.E. Entrapment of Aphids and Whiteflies in Lettuce Latex. **Annals of the Entomological Society of America**, Volume 88, Issue 2, Pages 163–172, 1995.

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

EMMONS, D.B. Milk clotting enzymes estimating cheese yield losses from proteolysis during cheese making. **Journal of Dairy Science**, USA, v. 73, n. 8, p. 2016 – 2021. 1990.

FABRICANTE, J.R.; OLIVEIRA, M.N.; Siqueira-Filho, J.A. Aspects of the ecology of *Calotropis procera* (Apocynaceae) in an area of dry forest altered by works of the Integration Project of the San Francisco River in Mauriti, CE. **Rodriguésia [online]**, Rio de Janeiro, v.64, n.3, pp.647-654, 2013.

FARIAS, V.A. de. Peptidases cisteínicas de noni (*Morinda citrifolia* L.) como agentes coagulantes de leite. **Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica**, 103 f., Fortaleza, 2016.

FENELON, M.A.; GUINEE, T.P. The effect of Milk fat on Cheddar cheese yield and its prediction, using modifications of the Van Slyke cheese yield formula. **Journal of Dairy Science**, USA, v.82, p.2287-2299, 1999.

FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU, R.T. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.23, p.162-165, 2003.

FARREL, B.D.; DUSSOURD, D.E.; MITTER, C. Escalation of plant defense: Do latex and resin canals spur plant diversification? **The American Naturalist**, USA, 138(4): 881-900, 1991.

FEIJOO-SIOTA, L.; VILLA, T. G. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. **Food Bioprocess Technology**, USA, v.4; p. 1066-1088, 2011.

FERREIRA, M.B. Distrito Federal e Goiás sob ameaça de invasora *Calotropis procera* (Ait). **Revista Cerrados**, Brasília, v.21; p.20-22, 1973.

FERREIRA, M.B.; Gomes, V. *Calotropis procera* (Ait) R. Br. uma invasora a ser estudada e controlada no Estado de Minas Gerais. **Oréades**, Belo Horizonte, v. 5; p. 68-75, 1976.

FIOL, C.; PRADO, D.; MORAB, M.; ALAVAA, J. Nettle cheese: Using nettle leaves (*Urtica dioica*) to coagulate milk in the fresh cheese making process. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, [S.l.], 4: p.19–24, 2016.

FOEGEDING, E. A.; DRAKE, M. A. Sensory and Mechanical Properties of Cheese Texture. **American Dairy Science Association**, North Carolina, 90:1611–1624 doi:10.3168/jds.2006-703, 2007.

FOGAÇA, D. N. L. Avaliação de propriedades mecânica, físico-químicas e influência do tipo de acidificante e tempo de armazenamento visando à aplicação no controle do processo de produção de queijos de coalho. **Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**, 75f., Itapetinga, 2014.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal Biological Chemistry**, USA, v.226, n.1, p.497-509, 1957.

FONSECA, K. C.; MORAIS, N. C. G.; QUEIROZ, M. R.; SILVA, M. C.; GOMES, M. S.; COSTA, F. O.; MAMEDE, C. C. N.; TORRES, F. S.; PENHA-SILVA, N.; BELETTI, M. E.; CANABRAVA, H. A. N.; OLIVEIRA, F. Purification and biochemical characterization of Eumiliin from *Eufhorbia milii* var. *hislopii* latex. **Phytochemistry**, [S.I.], v.71: p.708-715, 2010.

FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; McSWEENEY, P.L.H. Fundamentals of Cheese Science. **Aspen Publishers**, Gaithersburg, MD, 2000.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. Qualidade do leite e controle de mastite. **Lemos Editorial**, São Paulo, 175p., 2000.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. Dairy Chemistry and Biochemistry. Published by **Blackie Academic & Professional**, an imprint of Thomson Science, 2-6 Boundary Row, London SE1 8UK. First ed. 478p., 1998.

FREITAS, C. D. T. Proteínas do látex de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. e seus efeitos sobre pragas agrícolas. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica Vegetal) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2006.

FREITAS, C. D. T. Identificação, purificação, caracterização e atividade biológica de proteínas do látex de *Calotropis procera* envolvidas na defesa da planta. **Tese (Doutorado em Bioquímica Vegetal) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2009.

FREITAS, C.D.T.; OLIVEIRA, J.S.; MIRANDA, M.R.A.; MACEDO, N.M.R.; SALES, M.P.; VILLAS-BOAS, L.A.; RAMOS, M.V. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S.I.] v. 45: p.781e789, 2007.

FREITAS, C.D.T.; LOPES, J.L.; BELTRAMINI, L.M.; OLIVEIRA, R.S.B.; OLIVEIRA, J.T.A.; RAMOS, M.V. Osmotin from *Calotropis procera* latex: New insights into structure and antifungal properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S.I.], 2501–2507 pages, 2011.

FREITAS, C.D.T., LEITE, H.B., OLIVEIRA, J.P.B., AMARAL, J.L., EGITO, A.S., VAIRO-CAVALLI, S., LOBO, M.D.P., MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O. RAMOS, M.V. Insights in to milk-clotting activity of latex peptidases from *Calotropis procera* and *Cryptostegia grandiflora*. **Food Research International**, England, v.87, p. 50–59, 2016.

FREITAS FILHO, J.R.; SOUZA FILHO, J.S.; OLIVEIRA, H.B.; ANGELO, J.H.B.; BEZERRA, J.D.C. Avaliação da qualidade do queijo “coalho” artesanal fabricado em Jucati – PE. **Revista Eletrônica de Extensão**, Florianópolis, v.6, n.8, p.35-49, 2009.

FREITAS, E. C. de; TRAVASSOS, A. E. R.; MACIEL, J; F. Avaliação Microbiológica e Físico-Química de Leite Cru e Queijo de Coalho Produzidos no Estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.15 (1), p.35-42, 2013.

FREITAS, C. D. T., Silva, M. Z. R., Oliveira, J. P. B., Silva, A. F. B., Ramos, M. V., & Sousa, J. S. Study of milk coagulation induced by chymosin using atomic force microscopy. **Food Bioscience**, England, 29, 81–85, 2019.

FURTADO, M.M. Quesos Típicos de Latinoamérica. (1° Ed.) **Fonte Comunicações e Editora**, São Paulo. 192p. 2005.

GEORGE, S.; RAJU, V.; KRISHNAN, M.R.V.; SUBRAMANIAN, T.V.; JAYARAMAN, K. Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. **Process Biochemistry**, Oxford, K, v.30, p.457-62, 1995.

GIMÉNEZ, A.; ARES, F.; ARES, Gastón. Sensory shelf-life estimation: A review of current methodological approaches. **Food Research International**, Montevideo, v. 1, n. 49, p.311-325, jul. 2012.

GIORDANI, R.; GACHON, C.; BUC, J.; REGLI, P.; JACOB, J.L. Antifungal action of *Hevea brasiliensis* latex. Its effect in combination with fluconazole on *Candida albicans* growth. **Mycoses**, [S.l.], v.42; p.465-474, 1999.

GOHEL, S.D.; SING, S.P. Purification strategies, characteristics and thermodynamic analysis of a highly thermostable alkaline protease from a salt-tolerant *Alkaliphilic actinomycete*, *Nocardioopsis alba* OK-5. **J. chromatogr. B.**, USA, v.889; p.61-8, 2012.

GOUVÊA, C. A. L., DIAS, J. D. C. Caracterização do queijo Marajó e levantamento do pessoal envolvido no processo para orientação e inserção social. **Dissertação de Mestrado (Curso de Tecnologia Agroindustrial)**, 89 f., Universidade do Estado do Pará, Belém, 2004.

GONÇALVES, A.C.; YOSHIHARA, M.M.; CARVALHO, E.A.; STREY, L.; MORAES, A.J. Teores de nutrientes e metais pesados em plantas de estragão submetidas a diferentes fertilizações. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 46, n. 2, p. 233-240, Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, abr-jun, 2015.

GREEN, M.L. Review of the progress of dairy science: milk coagulants. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v. 44(1):159-88, 1977.

HAGEL, J.M. Quantitative ¹H NMR metabolite profiling as a functional genomics platform to investigate alkaloid biosynthesis in opium poppy. **Plant Physiol.**, USA, v.147, pp. 1805-182, 2008.

HAGEL, J. M.; YEUNG, E.C.; FACCHINI, P.J. Got milk? The secret life of laticifers. **Trends in Plant Science**, Netherlands, Vol.13 No.12, 2008.

HARTLEY, BS. Proteolytic Enzymes. **Annu. Rev. Biochem.**, USA, v.29: p.45-72, 1960.

HARRIS, M.; PELEG, M. Patterns of textural changes in brittle cellular foods caused by moisture sorption. **Cereal Chemistry**, USA, v. 73, p. 225-231, 1996.

HEDSTROM, L. Serine protease: mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, USA, v. 102: 4501-4524, 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª ed., 1ª ed. **Digital**, São Paulo, 1020p., 2008.

IVENS, K.O.; BAUMERT, J.L.; HUTKINS, R.L.; TAYLOR, S.L. Effect of proteolysis during Cheddar cheese aging on the detection of milk protein residues by ELISA. **Journal of Dairy Science**, USA, v.100 n.3, 2017.

JACOB, M.; JAROS D.; ROHM, H. Recent advances in milk clotting enzymes. **Int. J. Dairy Technol.**, USA, v. 64, p. 14–33. 2011.

JERONIMO, M. O cotidiano no ensino do processamento de queijos: recursos instrucionais alternativos. 118f. **Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Instituto de Agronomia, 2005.

JOHN, K. S.; BHAT, S. G.; RAO PRASADA, U. J. S. Biochemical characterization of sap (latex) of a few Indian mango varieties. **Phytochemistry**, Netherlands, v. 62: p. 13-19, 2003.

JUCÁ, T.; CUNHA, M.; CAVALCANTE, E.; RAMOS, M. Aspectos etnobotânicos e potencial farmacológico de plantas laticíferas localizadas no sítio São Vicente, Município de Santana dos Matos, Rio Grande do Norte. **Revista Extensão & Sociedade**, Rio Grande do Norte, v. 8, n. 2, p. 49-58, 2018.

JUDD, W.S.; SANDERS, R.W.; DONOGHUE, M.J. Angiosperm family pairs: Preliminary phylogenetic analyses. **Harvard Papers in Botany**, USA, v.5: p.1-51, 1994.

KAREL, M.; LUND, D. B. Physical Principles of Food Preservation. **CRC Press**, USA, 2003.

KARIMI, K.; ZAMANI, A. *Mucor indicus*: Biology and industrial applications perspectives: A review. **Biotechnology advances**, Netherlands, January with 105 Reads, 2013.

KEKWICK, R. G. O. Latex and laticifers. **Encyclopedia of Life Science, Nature Publishing Group**, London, p.1-6, 2001.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. Plantas infestantes e nocivas. 2ª ed. **Editora BASF**, São Paulo, 978p, 1999.

KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**, Netherlands, v.72(13): p.1510-30, 2011.

KONNO, K.; AGRAWAL, A.A. Latex: A Model for Understanding Mechanisms, Ecology, and Evolution of Plant Defense Against Herbivory. **Annual Review of Ecology, Evolution and systematics**, USA, v. 40, 2009.

KOSIKOWSKI, F. Cheese and fermented milk foods. **Second Edition 3rd Printing-with revisions**. P.O. Box 139, Brooktondale, 711p., 1982.

KROLOW, C.R.; RIBEIRO, M. E. R.; Obtenção de leite com qualidade e elaboração de derivados. Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**, Rio Grande do Sul. 66p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 154), 2006.

KUMAR, A.; SHARMA, J.; MOHANTY, A.K.; GROVER, S.; BATISH, V.K. Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). **Comp. Bioch. Phys.** [S.I.], Part B, v. 145, p. 108–113, 2006.

KUMARI, M.; SHARMA, A.; JAGANNADHAM, M. V. Religiosin B, a milk-clotting serine peptidase from *Ficus religiosa*. **Food Chemistry**, Netherlands, v. 131, p. 1295-1303, 2012.

LARCHER, W. Ecofisiologia Vegetal. **RiMa**, São Carlos, SP, 398p., 2006.

LASHKARI, H.; KHOSROSHAHI, A.; MADADLOU, A.; ALIZADEH, M. Chemical composition and rheology of low-fat Iranian white cheese incorporated with guar gum and gum Arabic as fat replacers. **Journal of Food Science & Technology**, India, v.51 (10), p. 2584-2591, 2014.

LEAL, L.C.; LANNUZZI, L.; LEAL, I.R. Liberação ecológica de espécie invasora: entomofauna associada à *Calotropis procera* não afeta a germinação de sementes. **Revista Nordestina de Zoologia**, João Pessoa, v.4: p.112-117, 2010.

LEANDRO, J. J. Queijos do campo à mesa: 10.000 anos de história e tradição.: **Melhoramentos**, São Paulo, 1º Ed.170p., 2008.

LEITE, H.B. Aplicação de peptidases laticíferas para produção de queijo coalho vegetariano. **Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica**, Fortaleza, 2016.

LEITE JÚNIOR, B. R. C., OLIVEIRA, P. M., SILVA, F. J. M., & MARTINS, M. L. Qualidade microbiológica de alimentos de origem animal comercializados na região de Minas Gerais. **Vértices**, Rio de Janeiro, v.15(2), p.49-59, 2013.

LEMES, A. C.; PAVÓN, Y.; LAZZARONI, S.; ROZYCKI, S.; BRANDELLI, A. KALIL S. J. A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development. **LWT - Food Science and Technology**, USA, v. 66, p. 217-224. 2016.

LIMA, K.G.; MAGALHÃES, A.R.; ABREU, A.C. Atividade coagulante de leite e proteolítica de coagulante microbiológico e coalho genético – Influência do pH, temperatura e CaCl₂. **Revista Brasileira de Farmácia**, São Paulo, v. 77, n. 1, p. 11-14. 1996.

LIMA, K. O de; MORAIS, A. B.; XIMENES, G. N. C.; HONORATO, F. A.; ANDRADE, S. A. C; CORTEZ, N. M. S. Determinação do teor de matéria gorda em queijo coalho (tipo a e b) comercializados no estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, Brasil, v. 7, n. 1, 2017.

LINDLEY, J. Flora médica. **Ajay Book Services**, New Delhi, 1985.

LOGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, p.1063-1067, 2001.

LÓPEZ, M. B.; JORDÁN, M.J.; HELLIN, P.; CASTILLO, M.; LAENCINA, J. Kinetics of k-casein hidrolisis by different rennets and coagulant enzymes in Murciano-Granadina goat milk. **Journal Milchwissenschaft**, Germany, v. 52, n.7, p. 370 – 373. 1997.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Instituto Planatarum**, São Paulo, 512p, 2002.

LUCEY, J. A. Rennet-Induced Coagulation of Milk. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, [S.I.], p. 579-584, 2011

LYNN, K.R. & CLEVETTE-RADFORD, N.A. Biochemical properties of latices from the Euphorbiaceae. **Phytochemistry**, Netherlands, v.26: p.939-944, 1987b.

MABBERLEY, D.J. The plant-book-portable dictionary of the vascular plants .2 ed. **Cambridge University Press**, England, 771p. 1997.

MACHADO, E. C.; FERREIRA, C.L.L.F.; FONSECA, L.M.; SOARES, F.M.; JUNIOR, F.N.P. Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal do Serro, Minas Gerais. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 516-521, 2004.

MARQUARDT, L. BACCAR, N. M.; ROHFLES, A. L. B.; OLIVEIRA M. S. Manual para elaboração de queijos diferenciados. **Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC**, Rio Grande Do Sul, 2013.

MARTINS, G. A. S. Determinação da vida-de-prateleira por testes acelerados de doce em massa de banana cv. prata. 103 f. **Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras**, Lavras, 2009.

MAZORRA-MANZANO, M.A.; MORENO-HERNÁNDEZ, J.M.; RAMÍREZ-SUAREZ, J.C.; TORRES-LIANEZ, M.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A.F.; VALLEJO-CÓRDOBA, B. Sour orange *citrus aurantium* L. flowers: A new vegetable source of milk-clotting proteases. **Food Sci. Technol.**, [S.l]. v.12; p.325-30, 2013.

MEDEIROS, W.L.B. Constituintes químicos de *Tabernaemontana* Mart (Apocynaceae). **Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Seropédica – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ**, 139p., 2003.

MESQUITA, A.C.; OLIVEIRA, L.E.M.; CAIRO, P.A.R.; VIANA, A.A.M. Sazonalidade da produção e características do látex de clones de seringueira em Lavras, MG. **Bragantia**, Campinas, v.65, n. 4, p. 633-639, 2006.

MILKPOINT. **As grandes oportunidades do mercado de queijos no Brasil. Vários autores, Panorama de mercado em 05/02/2015.** Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/panorama-mercado/as-grandes-oportunidades-do-mercado-de-queijos-no-brasil-93301n.aspx>> Acesso em 10 Jan. 2019.

MILKPOINT. **Abiq: mercado de queijos tem alto potencial de crescimento no Brasil. Giro de Notícia em 29/05/2017.** Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/abiq-mercado-de-queijos-tem-alto-potencial-de-crescimento-no-brasil-105515n.aspx>>. Acesso em 10 Jan. 2019.

MONTEIRO, V.N.; SILVA, R. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **R. Processos Químicos**, Goiás, v.3: p.9-23, 2009.

MONTEIRO C. L. B. Análise sensorial - Seleção e treinamento de equipes de degustadores. **Boletim do Centro de Pesquisa em Processamento de Alimentos**, Paraná, v.2(1):p.19-26, 1984.

MORCELLE, S. R.; CAFFINI, N. O.; PRIOLO, N. Proteolytic properties of *Funarium clausum* Latex. **Fitoterapia**, Spain, v.75: p.480- 493, 2004.

MOURSY, L. E. Insecticidal activity of *Calotropis procera* extracts of the flesh fly, *Sarcophaga hemorrhoidalis* fallen. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, Egypt, v.27(2): p.505-514, 1997.

MUNCK, A.V. Queijo de Coalho – Princípios básicos da fabricação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.59, n.339, p.13-15, 2004.

MURTHY, P.S.; KUSOMOTO, K. Acid protease production by *Aspergillus oryzae* on potato pulp powder with emphasis on glycine releasing activity: A benefit to the food industry. **Food & Bioproducts Processing**, England, v.96:p.180-8, 2015.

NASCIMENTO, G.V. CARDOSO, E. A.; BATISTA, N. L.; SOUZA B. B. CAMBUÍ G. B. Indicadores produtivos, fisiológicos e comportamentais de vacas de leite. **Agropecuária Científica no Semiárido**, Campina Grande, v. 9, n. 4, p. 28-36, 2013.

- NASSU, R.T.; MACEDO, B.A.; LIMA, M.H.P. Queijo de Coalho. **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, DF. p. 45, 2006.
- NAVEENA, B.M.; MENDIRATTA, S.K.; ANJANEYULU, A.S.R. Tenderization of buffalo meat using plant proteases from *Cucumis trigonus Roxb* (Kachri) and *Zingiber officinale roscoe* (Ginger rhizome). **Meat. Science**, Netherlands, v.11; p.363-9, 2004.
- NEURATH, H. Evolution of proteolytic enzymes. **Science**, USA, v. 224, p.350-357, 1984.
- NESTOR, G. M.; RUBÍ C. G. D.; HÉCTOR, J. C. Exploring the milk-clotting properties of a plant coagulant from the berries of *S. elaeagnifolium* var. *Cavanillies*. **Journal of Food Science**, USA, V. 71, p. 89-94, 2012.
- NUNES, M. O. Efeito de uma biomembrana de proteínas do látex de *Calotropis procera* (AIT.) R. BR na cicatrização: Estudos pré-clínico e clínico piloto. 81 f. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2017.
- OTANI, H.; MATSUMORI, M.; HOSONO, A. Purification and some properties of a milk clotting protease from the young seeds of *Albizia julibrissin*. **Nihon Chikusan Gakkaiho**, Japan, 62(5):424-432, 199.
- PAUL, T.; JANA, A.; MANDAL, A.; HALDER, S.K.; DAS MOHAPATRA, P.K. Smart cleaning-in-place process through crude keratinase: an eco-friendly cleaning techniques towards dairy industries. **Journal of Cleaner Production**, England, v.8;p:140-53, 2014.
- PAULA, J.C.J.; CARVALHO, A.F.; FURTADO, M.M.; Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, Mar/Jun, nº 367/368, 64: 19-25, 2009.
- PEREZ, R.M. Perfil sensorial, físico-químico e funcional de queijo de coalho comercializado no município de Campinas. 122 f. **Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, 2005.
- PICKARD, D.F. Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. **New Phytologist.**, England, v.177: p.877–888, 2008.
- PONTUAL, E.V., CARVALHO, B.E.A., BEZERRA, R.S., COELHO, L.C.B.B., NAPOLEÃO, T.H.; PAIVA, P.M.G. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. **Food Chemistry**, England, v. 135, p. 1848-1854, 2012.
- POWERS, J.C.; ASGIAN, J.L.; EKICI, O.D.; JAMES, K.E. Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases. **Chemistry Reviews**, England, v. 102 p. 4639-4750, 2002.

QUEIROGA, R. C. R. E.; SANTOS, B. M.; GOMES, A. M.; MONTEIRO, M. J.; TEIXEIRA, S. M.; SOUZA, E. L.; PEREIRA, C. J. D.; PINTADO, M. M. E. Nutritional, textural and sensory properties of coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. **Food Science and Technology**, England, v. 50, n. 1, p. 538-544, 2013

Rahman, M.A. & Wilcock, C.C. A taxonomic revision of *Calotropis* (Asclepiadaceae). **Nordic Journal of Botany**, USA, v.11: p.301-308, 1991.

RAMOS, M. V.; FREITAS, C. D. T.; STANISÇUASKI F.; MACEDO, L. L. P.; SALES, M.P.; SOUZA, D. P.; CARLINI C. R. Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from *Calotropis procera*: role of laticifer proteins in plant defense. **Plant Science** (Limerick), Ireland, v.173: p.349-357, 2007.

RAO, M.B; TANKSALE, A.M, GHATGE, M.S, DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, USA, v. 62(3): p.597-635, 1998.

RAPOSO S.; DOMINGOS, A. Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures. **Process Biochemistry**, England, v.43(2):p.139-44, 2008.

RAWDKUEN, S.; JAIMAKREU, M.; BENJAKUL, S. Physicochemical properties and tenderness of meat samples using proteolytic extract from *Calotropis procera* latex. **Food Chemistry**, England, v.136(2): p.909-16, 2013.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, England, v.38 (Issue suppl 1), 2010.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. Evolutionary families of peptidases. **The Biochemical Journal**, England, v.290: p.205-218, 1993.

RICHARDSON, G.H. Standard methods for examination of dairy products. 15aed., Washington, DC: **Am. Public Health Association**, USA, 1985.

ROSEIRO, L.B.; BARBOSA, M.; AMES, J.M.; WILBEY, A. Cheesemaking with vegetable coagulants — the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. **International Journal of Dairy Technology**, England, v. 56, No 2 May 2003.

SALOTTI, B. M. et al. Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, Brasil, v. 73, n. 2, p. 171-175, 2006.

SANTANA, R.F.; SANTOS, D.M.; MARTINEZ, A.C.C.; LIMA, Á.S. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, Brasil, v.60, n.6, p.1517-1522, 2008

SANTOS, B. M.; OLIVEIRA, M. E. G. de; SOUSA, Y. R. F. de; MADUREIRA, M. E. G. de; PINTADO, M. M. E.; GOMES, A. M. P.; SOUZA, E. L. de; QUEIROGA, R. de C. R. do E. Caracterização físico-química e sensorial de queijo de coalho produzido com mistura de leite de cabra e de leite de vaca. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, Brasil, v.70 (3), p.302-310, 2011.

SCHALLER, A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. **Planta**, Berlin, v. 220(2): 183-197, 2004.

SCHMELLER, T.; WINK, M. Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications. **Plenum Press**, New York, 1998.

SHAH, M. A.; MIR, S. A.; PARAY, M. A. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. **Dairy Sci. & Technol.**, Germany, v.94, p. 5-16. 2014.

SHARMA, G.K. 1934. *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea*. **Indian Journal Veterinary Science and Animal Husbandry**, India, v.4: p.63-74, 1934.

SILVA, M.C.C.; SILVA, A. B.; TEIXEIRA, F.M.; SOUSA, P.C.P.; RONDON, R.M. M.; HONÓRIO JR, J. E. R.; SAMPAIO, L. R. L.; OLIVEIRA, S. L.; HOLONDA, A. N.M.; VASCONCELOS, S.M.M. Therapeutic and biological activities of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, India, p.332-336, 2010.

SILVA, M.C.D.; RAMOS, A.C.S.; MORENO, I.; MORAES, J.O. Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de Coalho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.69, n.2, p.214-221, 2010.

SILVA, W. S. Comportamento mecânico do queijo de coalho tradicional, com carne seca, tomate seco e oregano armazenados sob refrigeração. 74 f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**, Itapetinga, 2013.

SILVA, H. C. Concentração do leite por nanofiltração, produção do queijo tipo coalho e caracterização tecnológica. 132 f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, 2013.

SILVA, P.L. Caracterização físico-química, microbiológica e perfil de textura instrumental de queijo coalho da região vale do Jaguaribe – CE. **Dissertação (Mestrado) - Instituto Federal do Ceará, Mestrado em Tecnologia de Alimentos**, Campus Limoeiro do Norte, 2017.

SMEWING, J. Testing times for texture care for sensory properties needed. **Fleischwirtschaft International**, [S.l.], 2006

SOUSA-GALLAGHER, M.J.; MALCATA, F.X. Proteolysis of Ovine and Caprine Caseins in Solution by Enzymatic Extracts from Flowers of *Cynara cardunculus*. **Enzyme and Microbial Technology**, USA, v.22(5):p.305-314, 1998.

SOUSA, A.Z.B.; ABRANTES, M.R.; SAKAMOTO, S.M.; SILVA, J.B.A.; LIMA, P.O.; LIMA, R.N.; ROCHA, M.O.C.; PASSOS, Y.D.B. Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico.**, São Paulo, v.81, n.1, p. 30-35, 2014.

SOUTO, P.C.; SALES, S.C.V.; SOUTO, J.S.; SANTOS, R.V.; SOUSA, A.A. Biometria de frutos e número de sementes de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br no Semi árido da Paraíba. **Revista Verde**. Brasil, v.3: p.108-113, 2008.

TORRES, M. J.; TREJO, S. A.; OBREGÓN, W. D., AVÍLES, F. X.; LÓPEZ, L. M. I., NATALUCCI, C. L. Characterization of the proteolytic system present in *Vasconcellea quercifolia* latex. **Planta**, Berlin, v. 236, p.1471-1484, 2012.

TRONCO, V. M. Manual para inspeção da qualidade do leite. 4. ed. Santa Maria: **Universidade Federal de Santa Maria**, Santa Maria, 206p., 1997.

USTUNOL, Z.; HICKS, C.L. Effect of calcium addition on yield of cheese manufactured with *Endothia parasitica* protease. **Journal of Dairy Science**, USA, v. 73, n. 1, p. 17-25. 1990.

VAIRO-CAVALLI S.; SILVA, S.V.; CIMINO, C.; MALCATA, F.X.; PRIOLO, N. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. **Food Chem.**, England, V.106, p. 997–1003, 2008.

VAN DER HOORN, R. A. L.; Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, USA, v.59,p.191–223. 2008.

VIDAL, R.H.L. Diagnóstico regional de queijo coalho comercializado em Natal/RN. **Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Norte-Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.** 73f.,2011.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G.J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, USA, v.65(1):p.1-43, 2001.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELEMA, A. VAN BOEKEL, M. A. J. S.; Dairy technology: principles of milk properties and processes. **Food science and technology**, New York – Basel. 727p. 1999.

WERNECK, G.C. Produção de protease por fungos endofíticos isolados de plantas do cerrado. 88 f. **Dissertação de Mestrado (Ciências da Saúde) Universidade de Brasília**, Brasília, DF, 2016.

YEANG, H. Y.; ARIF, S. A. M.; YUSOF, F.; SUNDERASAN, E. Allergenic proteins of natural rubber latex. **Methods**, [S.I.], v.27:p.32-45, 2002.

ZHAO, P.; DENG S.; DING, Y. LYU, F. Optimization of additive combination based on Lcysteine for inhibition of nonenzymatic browning in cooked rice during storage. **Journal of Food Processing and Preservation.**, USA, v. 39, p. 488-494. 2014.

ANEXO A – LAUDO TEOR DE METAIS REALIZADO NO COALHO DE ORIGEM VEGETAL

	FUNDAÇÃO NUCLEO DE TECNOLOGIA INDUSTRIAL DO CEARÁ		GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ <small>Secretaria de Ciência, Tecnologia e Inovação Agrícola</small>
GETAQ: NUTEA	ÁREA: Alimentos	RE N.º: 1151/18	1 de 3
2. RESULTADOS DOS ENSAIOS			
PARÂMETRO	Resultado (mg/100g)		
Alumínio - Al	0,703		
Antimônio - Sb	0,135		
Arsênio - As	0		
Bário - Ba	0,444		
Bismuto - Bi	0		
Boro - B	0		
Cálcio - Ca	31,204		
Cádmio - Cd	0,001		
Chumbo - Pb	0,005		
Cobalto - Co	0,002		
Cobre - Cu	0,384		
Cromo - Cr	0,071		
Escândio - Sc	0		
Estanho - Sn	0,021		
Estrôncio - Sr	1,281		
Ferro - Fe	2,182		
Fósforo - P	33,248		
Magnésio - Mg	83,206		
Manganês - Mn	0,151		
Molibdênio - Mo	0,143		
Níquel - Ni	0,260		
Potássio - K	248,160		
Selênio - Se	0,410		
Sódio - Na	782,572		
Vanádio - V	0,003		
Zinco - Zn	1,184		

OS RESULTADOS APRESENTADOS NESTE DOCUMENTO TÊM VALIDADEZ LEGÍTIMA E EFICÁCIA SE, AO LONGO DO PRAZO DE VALIDADE DO SERVIÇO, SUA REPRODUÇÃO EM OUTROS FÓRMS NÃO POSSERÁ SER FEITA DE FORMA INTEGRAL, SEM MENCIONAR ALTERAÇÃO.

Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará | Nutea
 CNPJ: 08.418.934/0001-04 | End.: Estadual 608-0216-1 | www.nutea.ce.gov.br | nutea@nutea.ce.gov.br
 Rua Professor Manoel Pinheiro, 429 - Cidade do Pici - Fortaleza/CE - CEP: 04218-902
 Núcleo Central de Atendimento ao Cliente | Fone: +55 85 3181.3446/3447 | Fax: +55 85 3135.2430
 E-mail: nutea@nutea.ce.gov.br | nutea@nutea.ce.gov.br



FUNDAÇÃO NÚCLEO DE
TECNOLOGIA INDUSTRIAL
DO CEARÁ



GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ
Secretaria de Ciência, Tecnologia
& Inovação Agrária

GETAQ: NUTEA	ÁREA: Alimentos	RE N.º: 1151/18	1 de 3
--------------	-----------------	-----------------	--------

3. CONDIÇÕES GERAIS

Metodologia: POT-76 ;Método adaptado de AOAC OFFICIAL METHOD 999.10. Metodologia de acordo com o Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal, método n° 38. MILESTONE Application Note HPR-FO-07.

Fortaleza, 18 de abril de 2018

Márcia Helena Portela Lima
Engenheira de Alimentos
CREA – CE Nº 8510 - D
Núcleo de Alimentos - NUTEA

Jackson de Queiroz Malveira
Tecnólogo em Produção Industrial
CRQ- X: LP-04/17 - 10ª Região
Gerente da GETAQ

OS RESULTADOS APRESENTADOS NESTE DOCUMENTO SÃO DE RESPONSABILIDADE EXCLUSIVA DO ORÇÃO DE BOMBADEAMENTO E NÃO DEBEM SER REPRODUZIDOS SEM A AUTORIZAÇÃO DA NUTEA.

Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará | NUTEA
CNPJ 06.410788/0001-04 | Rua. Ceará, 60022015 | www.nutea.org.br | contato@nutea.org.br
Rua Professor Manoel Pereira, 36 - Campus de Pici - Fortaleza/CE - CEP: 60419-522
Núcleo Central de Alimentação do Ceará | Fone: (85) 3333-2446/2447 | Fax: (85) 3333-2438
Ondulada, Fone: (85) 3333-2438 | contato@nutea.org.br

ANEXO B – ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO COALHO DE ORIGEM VEGETAL

	Universidade Federal do Ceará Centro de Ciências Agrárias Departamento de Engenharia de Alimentos Laboratório de Microbiologia de Alimentos FORMULÁRIO ADMINISTRATIVO RELATÓRIO DE ENLAIADO DE ALIMENTOS	Código:FA.33
		Emissão:09/01/2018
		Revisão:00
		Página:1/1
		Cópia Controlada

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS

LAUDO Nº408/ 2018

SOLICITANTE:	MARTA ROCHELLE S. CHAGAS
ENDEREÇO:	SITIO SÃO RAIMUNDO, S/N, ZONA RURAL, LIMOEIRO DO NORTE, CEARÁ.
AMOSTRA ANALISADA:	PROTEASE LP CP
MARCA COMERCIAL:	NÃO INFORMADO
LOTE:	NÃO INFORMADO
DATA DE FABRICAÇÃO:	NÃO INFORMADO
DATA DE VALIDADE:	NÃO INFORMADO
RESPONSÁVEL PELA COLETA:	MARTA ROCHELLE S. CHAGAS
DATA DO INÍCIO DA ANÁLISE:	13/03/2018
DATA DO TÉRMINO DA ANÁLISE:	16/03/2018
ANALISTA:	IANA PEREIRA
NÚMERO DE AMOSTRAS ANALISADAS:	UMA AMOSTRA DE 200g
METODOLOGIA UTILIZADA:	AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, 2001.

RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE ALIMENTOS

ANÁLISES	RESULTADOS	PADRÕES MICROBIOLÓGICOS SANITÁRIOS PARA ALIMENTOS (ANVISA, 2001)*
Salmonella sp. /25g	AUSÊNCIA	AUSÊNCIA
Coliformes a 48°C (UFC/g)	10 ²	10 ²
E. coli (UFC/g)	<10,0	Não especificado

OBSERVAÇÃO: Este laudo se refere à amostra analisada e somente pode ser reproduzido por completo.

CONCLUSÃO: Em relação aos micro-organismos analisados, a amostra indicativa está de acordo com padrões legais vigentes. *Resolução = RDC Nº12, de 2 de Janeiro de 2001, Ministério da Saúde, BRASIL (2001).

Fortaleza, 16 de março de 2018.

Av. Mister Hull, 2977, Alagadiça, Campus Universitário do Piauí
 FONE-FAX: (88) 3366 97 44, e-mail: ufma@gmail.com

Site: www.ufma.com

ASTEP - CNPJ: 07.778.137/0001-10

ESTE LABORATÓRIO TEM APROVAÇÃO NACIONAL EM TESTE DE PROFICIÊNCIA EMITIDO PELO PEP-SENA/CTAL

ANEXO C – ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO LACTOVEGETARIANO

	Universidade Federal do Ceará Centro de Ciências Agrárias Departamento de Engenharia de Alimentos Laboratório de Microbiologia de Alimentos FORMULÁRIO ADMINISTRATIVO RELATÓRIO DE ENSAIO DE ALIMENTOS	Código: PA.33 Emissão: 09/01/2018 Revisão: 00 Página: 1/1 Cópia Controlada
---	--	--

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS

LAUDO Nº 038/ 2018

SOLICITANTE:	MARTA ROCHELLE S. CHAGAS
ENDEREÇO:	SÍTIO SÃO RAIMUNDO, S/N, ZONA RURAL, LIMOEIRO DO NORTE, CEARÁ.
AMOSTRA ANALISADA:	QUEIJO DE COALHO VEGETARIANO
MARCA COMERCIAL:	NÃO INFORMADO
LOTE:	NÃO INFORMADO
DATA DE FABRICAÇÃO:	NÃO INFORMADO
DATA DE VALIDADE:	NÃO INFORMADO
RESPONSÁVEL PELA COLETA:	MARTA ROCHELLE S. CHAGAS
DATA DO INÍCIO DA ANÁLISE:	17/04/2018
DATA DO TÉRMINO DA ANÁLISE:	20/04/2018
ANALISTA:	IANA FERREIRA
NÚMERO DE AMOSTRAS ANALISADAS:	UMA AMOSTRA DE 303g
METODOLOGIA UTILIZADA:	AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, 2001.

RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE ALIMENTOS

ANÁLISES	RESULTADOS	PADRÕES MICROBIOLÓGICOS SANITÁRIOS PARA ALIMENTOS (ANVISA, 2001)*
Salmonella sp. /25g	AUSÊNCIA	AUSÊNCIA
Coliformes a 45°C (NMP/g)	<10,0	10 ³
E. coli (NMP/g)	<10,0	Não especificado

OBSERVAÇÃO: Este laudo se refere à amostra analisada e somente pode ser reproduzido por completo.

CONCLUSÃO: Em relação aos micro-organismos analisados, a amostra indicativa está de acordo com padrões legais vigentes. *Resolução – RDC Nº12, de 2 de Janeiro de 2001, Ministério da Saúde, BRASIL (2001).

Fortaleza, 20 de abril de 2018.

Av. Miter Hill, 2977, Alagadiço, Campus Universitário do Pici
 FONE-FAX (85) 3366 97 44, e-mail: ufama@gmail.com

Site: www.ufama.com

ASTEP - CNPJ: 07.778.137/0001-10

ESTE LABORATÓRIO TEM APROVAÇÃO NACIONAL EM TESTE DE PROFICIÊNCIA EMITIDO PELO FEP-SENAI-CTAL

ANEXO D – ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO LEITE PASTEURIZADO

	Universidade Federal do Ceará	Código:FA.33
	Centro de Ciências Agrárias	Emissão:09/01/2018
	Departamento de Engenharia de Alimentos	Revisão:00
	Laboratório de Microbiologia de Alimentos	Página:1/1
	FORMULÁRIO ADMINISTRATIVO	Cópia Controlada

RELATÓRIO DE ENSAIO DE ALIMENTOS

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS

LAUDO Nº667/ 2018

SOLICITANTE:	MARTA ROCHELLE S. CHAGAS
ENDEREÇO:	SITIO SÃO RAIMUNDO, SN, ZONA RURAL, LIMOEIRO DO NORTE, CEARÁ.
AMOSTRA ANALISADA:	LEITE PASTEURIZADO INTEGRAL
MARCA COMERCIAL:	NÃO INFORMADO
LOTE:	NÃO INFORMADO
DATA DE FABRICAÇÃO:	NÃO INFORMADO
DATA DE VALIDADE:	NÃO INFORMADO
RESPONSÁVEL PELA COLETA:	MARTA ROCHELLE S. CHAGAS
DATA DO INÍCIO DA ANÁLISE:	18/04/2018
DATA DO TÉRMINO DA ANÁLISE:	24/04/2018
ANALISTA:	IANA PEREIRA
NÚMERO DE AMOSTRAS ANALISADAS:	UMA AMOSTRA DE 100mL
METODOLOGIA UTILIZADA:	AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA), Compendium of methods for the microbiological examination of foods, Washington, 2001.

RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE ALIMENTOS

ANÁLISE	RESULTADO	PADRÕES MICROBIOLÓGICOS SANITÁRIOS PARA ALIMENTOS (ANVISA, 2001)*
Salmonela sp. (25mL)	AUSÊNCIA	AUSÊNCIA
Coliformes a 48°C (NMP/mL)	<10,0	10 ²
E. coli (NMP/mL)	<10,0	Não especificado

OBSERVAÇÃO: Este laudo se refere à amostra analisada e somente pode ser reproduzido por completo.

CONCLUSÃO: Em relação aos micro-organismos analisados, a amostra indicativa está de acordo com padrões legais vigentes. *Resolução - RDC Nº12, de 2 de Janeiro de 2001, Ministério da Saúde, BRASIL (2001).

Fortaleza, 24 de abril de 2018.

Av. Mister Hill, 3977, Alagoinhas, Campus Universitário do Pici
 FONE-FAX (85) 3366 97 44, e-mail: ufma@gmail.com
 Site: www.ufma.com

ASTEF - CNPJ: 07.778.137/0001-10

ESTE LABORATÓRIO TEM APROVAÇÃO NACIONAL EM TESTE DE PROFICIÊNCIA EMITIDO PELO PEP-SENAI-CTAL

ANEXO E – ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO CONTROLE COMERCIAL

	Universidade Federal do Ceará Centro de Ciências Agrárias Departamento de Engenharia de Alimentos Laboratório de Microbiologia de Alimentos FORMULÁRIO ADMINISTRATIVO RELATÓRIO DE ENSAIO DE ALIMENTOS	Código: PA.33
		Emissão: 08/01/2018
		Revisão: 00
		Página: 1/1
		Cópia Controlada

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS

LAUDO N°640/ 2018

SOLICITANTE:	MARTA ROCHELLE S. CHAGAS
ENDEREÇO:	SITIO SÃO BARRUNDO, SN, ZONA RURAL, LIMOEIRO DO NORTE, CEARÁ.
AMOSTRA ANALISADA:	QUEIJO DE COALHO COMERCIAL (CONTROLE)
MARCA COMERCIAL:	NÃO INFORMADO
LOTE:	NÃO INFORMADO
DATA DE FABRICAÇÃO:	NÃO INFORMADO
DATA DE VALIDADE:	NÃO INFORMADO
RESPONSÁVEL PELA COLETA:	MARTA ROCHELLE S. CHAGAS
DATA DO INÍCIO DA ANÁLISE:	17/04/2018
DATA DO TÉRMINO DA ANÁLISE:	20/04/2018
ANALISTA:	IANA PEREIRA
NÚMERO DE AMOSTRAS ANALISADAS:	UMA AMOSTRA DE 370g
METODOLOGIA UTILIZADA:	AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, 2001.

RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE ALIMENTOS

ANÁLISE	RESULTADO	PADRÕES MICROBIOLÓGICOS SANITÁRIOS PARA ALIMENTOS (ANVISA, 2001)*
<i>Salmonella</i> sp. /25g	AUSÊNCIA	AUSÊNCIA
Coliformes a 48°C (NMP/g)	<10,0	10 ³
<i>E. coli</i> (NMP/g)	<10,0	Não especificado

OBSERVAÇÃO: Este laudo se refere à amostra analisada e somente pode ser reproduzido por completo.

CONCLUSÃO: Em relação aos micro-organismos analisados, a amostra indicativa está de acordo com padrões legais vigentes. *Resolução – RDC Nº12, de 2 de Janeiro de 2001_ Ministério da Saúde, BRASIL (2001).

Fortaleza, 20 de abril de 2018.

Av. Miter Hull, 2577_ Alagadiça_ Campus Universitário do Pici
 FONE-FAIX (85) 3366 97 44_ e-mail: ufama@gmail.com
 Site: www.ufcma.com

ASTEP - CNPJ: 07.778.137/0001-10

ESTE LABORATÓRIO TEM APROVAÇÃO NACIONAL EM TESTE DE PROFICIÊNCIA EMITIDO PELO FEP-SENA-CTAL

ANEXO F - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada "TESTE SENSORIAL DE QUEIJO FORMULADO COM COALHO VEGETAL". Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Objetivos:

O presente teste tem como objetivo analisar sensorialmente um queijo vegetariano produzido a partir de um coalho de origem vegetal oriundo de uma planta amplamente encontrada no estado do Ceará (*Calotropis procera*). Os testes sensoriais serão aplicados uma vez que a formulação do coalho vegetal utilizado na fabricação do queijo vegetariano, foi amplamente estudado e os resultados por meio de pesquisas, comprovaram que não existe alteração alguma quando administrado por via oral. Os resultados satisfatórios quanto à qualidade físico-química e microbiológica foram comprovados em testes prévios.

Procedimentos:

Participando do estudo você está sendo convidado a:

- Responder um questionário contendo perguntas socioeconômicas e sobre sua preferência e hábitos alimentares em relação ao consumo de queijo.
- O questionário será aplicado em dia, horário e local apropriado e de acordo com a sua disponibilidade.
- O questionário tem uma estimativa de tempo equivalente a mais ou menos 05 minutos.
- Após a análise das respostas coletadas o questionário será descartado a partir de recortes do mesmo.
- Após o questionário, você será convidado a degustar uma amostra de queijo vegetariano disponível em cubos de 20g (contendo os ingredientes em sua formulação: leite pasteurizado, coalho vegetariano, cloreto de cálcio e cloreto de sódio). As amostras serão servidas com bolacha salgada e água. Essa etapa ocorrerá em no máximo 10 min.
- O participante terá que ficar em observação por 1 hora após a ingestão do produto e que o mesmo deve ser acompanhado por um período de 72 horas (três dias) após a sua participação, para avaliação de ocorrência de eventuais reações adversas.
- O provador e participante dessa análise sensorial assinará o TCLE permitindo uso dos dados e de sua imagem para fins acadêmicos.

Benefícios:

De imediato o consumo do queijo vegetariano não trará benefícios à sua saúde, mas irá contribuir para a melhoria de um produto que será lançado no mercado, voltado para o vegetariano e consumidores específicos.

Riscos e Desconfortos:

Caso você possua alergia ou intolerância a algum ingrediente (Leite, cloreto de cálcio e cloreto de sódio), você não deverá participar da pesquisa. Caso apresente algum desconforto ou indigestão que necessite de atendimento médico, o pesquisador responsável irá acompanhá-lo a um hospital mais próximo e assegurar atendimento, até que esteja bem.

Ressarcimento e Indenização:

Você terá direito ao ressarcimento das despesas diretamente decorrentes de sua participação na pesquisa e à indenização pelos danos resultantes desta, nos termos da Lei.

Sigilo e privacidade:

O uso dos dados e de sua imagem serão restritamente utilizados para fins acadêmicos, tendo a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores.

Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado. Não haverá nenhum pagamento decorrente à participação nessa pesquisa.

Todas as imagens obtidas nessa pesquisa, serão salvas em arquivos sob responsabilidade do responsável pela pesquisa e essas imagens poderão ser utilizadas para fins acadêmicos como seminários, apresentações de trabalhos científicos e relatórios. As imagens serão armazenadas por um período de 02 (dois) anos, após esse período as mesmas serão deletadas.

Em qualquer momento da pesquisa o participante poderá recusar a continuar com o teste, e que também poderá retirar o seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo. Em qualquer momento o participante poderá ter acesso a informações referentes à pesquisa, pelos telefones/ endereço dos pesquisadores.

Endereço d(os, as) responsável(is) pela pesquisa:

Nome: Prof^o Dr. Márcio Viana Ramos

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Bloco 907, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Campus do Pici, S/N Fortaleza-CE.

Telefones para contato: (85) 33669403

Nome: Prof^o Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Bloco 907, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Campus do Pici, S/N Fortaleza-CE.

Telefones para contato: (85) 3366 5816

Nome: Me. Sandro Rios Silveira
 Instituição: Universidade Federal do Ceará
 Endereço: Bloco 907, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Campus do Pici, SAN Fortaleza-CE.
 Telefones para contato: (85) 3366 3403

Nome: Profa. Mirele da Silveira Vasconcelos (RESPONSÁVEL PELA CONDUÇÃO DOS TESTES SENSORIAIS NO IFCE/BATURITÉ)
 Instituição: Instituto Federal do Ceará/ Campus Baturité
 Endereço: Av. Ouvidor Vitório Soares Barbosa, 160 - Sanharão, Baturité - CE, 62760-000. Setor de Ensino dos cursos de Gastronomia e Hotelaria.
 Telefones para contato: (85) 33479150

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) Rua Jorge Dumar, nº 1703 – Jardim América 60.410-426 – Fortaleza. CE Número telefônico: (85) 3401-2332
 E-mail: cep@ifce.edu.br

O abaixo assinado _____, ____anos, RG: _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, ____/____/____

Nome do participante da pesquisa	Data	Assinatura
Nome do pesquisador principal	Data	Assinatura
Nome do Responsável legal/testemunha (se aplicável)	Data	Assinatura
Nome do profissional que aplicou o TCLE	Data	Assinatura

**APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO DE RECRUTAMENTO DA ANÁLISE
SENSORIAL DO QUEIJO LACTOVEGETARIANO**

QUESTIONÁRIO DE RECRUTAMENTO PARA ANÁLISE SENSORIAL

1. Faixa etária:

() 18-30 anos.

() 31-50 anos.

() 51-60 anos.

2. Sexo:

() Masculino.

() Feminino.

3. Nível de escolaridade

() Ensino fundamental Incompleto.

() Ensino Fundamental Completo.

() Ensino médio Incompleto.

() Ensino médio completo.

() Superior Incompleto.

() Superior completo.

4. Você tem hábito de consumir queijos:

() Sim, com frequência.

() Esporadicamente (de vez em quando).

() Não consumo em nenhum momento.

**APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO DE ACEITAÇÃO DO QUEIJO
LACTOVEGETARIANO**

Ficha de Teste de Aceitação

Nome: _____ Data: _____

Amostra: Queijo Lactovegetariano

A) Prove a amostra e indique sua opinião em relação à aparência, aroma, sabor, textura e impressão global, de acordo com a escala abaixo:

- 9 – gostei muitíssimo**
- 8 – gostei muito**
- 7 – gostei moderadamente**
- 6 – gostei ligeiramente**
- 5 – nem gostei/ nem desgostei**
- 4 – desgostei ligeiramente**
- 3 – desgostei moderadamente**
- 2 – desgostei muito**
- 1 – desgostei muitíssimo**

Cor: _____ Aparência: _____ Aroma: _____ Textura _____
Sabor: _____ Impressão Global: _____

B) Se você encontrasse esse produto à venda, assinale utilizando a escala abaixo qual seria sua atitude em relação à compra do produto.

- 1- certamente não compraria este produto**
- 2 - eu provavelmente não compraria este produto**
- 3 - tenho dúvidas se compraria ou não este produto**
- 4 - eu provavelmente compraria este produto**
- 5 - eu certamente compraria este produto**

Comentários: _____

