



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

JÉSSICA FERREIRA ROCHA

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DE ATIVIDADE COAGULANTE DE LEITE DE
UMA PROTEASE DE SEMENTES DE NONI (*Morinda citrifolia*)

RIO DE JANEIRO
2023

JÉSSICA FERREIRA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DE ATIVIDADE COAGULANTE DE LEITE
DE UMA PROTEASE DE SEMENTES DE NONI (*Morinda citrifolia*)**

Monografia do Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. César Luis Siqueira Junior

RIO DE JANEIRO
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R672 Rocha, Jéssica

Caracterização bioquímica parcial de atividade coagulante de leite de uma protease de sementes de noni (*Morinda citrifolia*) / Jéssica Ferreira Rocha. — Rio de Janeiro: UNIRIO, 2023.

41 p. il.

Orientador: Prof. Dr. César Luis Siqueira Junior Siqueira Junior.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Ambientais) — Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2023.

1. Noni. 2. Milk-clotting. 3. Biotecnologia. I. Siqueira Junior, César Luis. II. UNIRIO. III. Título.

JÉSSICA FERREIRA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DE ATIVIDADE COAGULANTE DE LEITE
DE UMA PROTEASE DE SEMENTES DE NONI (*Morinda citrifolia*)**

Monografia do Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Ambientais.

Aprovado em 06 de fevereiro de 2023.

Dr. César Luis Siqueira Junior – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Orientador

Dr. Carlos Fernando Araújo Lima – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Dra. Sandra Zorat Cordeiro – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

*Dedico este trabalho a Deus e
à memória de meus avós, que
sempre torceram por mim.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu a oportunidade de estudar, me sustentou, guardou e me deu a salvação, sem Ele não estaria aqui.

Agradeço a meus pais pelo incentivo durante toda a minha vida acadêmica e por me apoiarem na escolha do curso. Nunca conseguirei agradecer o suficiente por tudo o que fizeram por mim, amo vocês!

Agradeço à minha família por todo amor, carinho e incentivo. Agradeço especialmente à minha tia Fátima Ferreira pelo seu apoio, e ao meu tio João, pela ajuda com as aulas de geologia.

Agradeço ao meu orientador Dr. Cesar Luís por me aceitar como orientanda e aluna em seu laboratório. Agradeço toda a paciência e dedicação com que me ensinou.

Agradeço aos doutores Carlos Fernando e Sandra Zorat por aceitarem compor minha banca avaliadora.

Agradeço aos meus amigos André, Cristina, Venâncio, Mariana, Heitor, Annelize, Paulo Micael, Lucas, Priscila, Matheus, Juliana, Jonas, Rafael, Gabriel Oliveira, Marinalva e Paulo por todas as vezes em que me apoiaram e fortaleceram minha fé.

Agradeço especialmente às minhas amigas Sabrina, Mirian e Natalia por todas as vezes em que me impediram de desistir, muito obrigada por serem bênção na minha vida, e ao meu amigo Rafael Matos, pela ajuda com o trabalho de metamerização.

Agradeço, em memória, ao meu tio Roberto, por sempre ficar feliz com as minhas conquistas, e aos meus avós, que depois dos meus pais, foram aqueles que mais torceram por mim. Vocês três não estão mais comigo, mas sigo os amando.

RESUMO

Os primeiros traços da existência do queijo remetem há aproximadamente 3000 anos a.C. (antes de Cristo), o que faz dele um dos alimentos manufaturados mais antigos. Por suas características nutricionais e organolépticas, o queijo se tornou um dos principais alimentos processados pelo homem a partir da época da domesticação de bovinos. A etapa fundamental para a elaboração do queijo é a coagulação do leite, processo que consiste na conversão do leite em estado líquido para gel e também é conhecido como coalhada. A principal enzima utilizada na indústria dos laticínios é a quimosina, protease extraída do quarto estômago de bezerros desmamados. As proteases, também chamadas de peptidases, são enzimas degradativas que catalisam a hidrólise de reações peptídicas em outras proteínas ou peptídeos, liberando aminoácidos livres ou peptídeos de tamanho variável. Elas possuem uma ampla diversidade de aplicações em diferentes indústrias; na alimentícia, são usadas principalmente na produção de queijos, já que atuam na hidrólise de proteínas do leite. Em função da diminuição da disponibilidade de estômagos de bezerros lactantes e do aumento do consumo de queijos, novas alternativas de coagulantes são necessárias. Os coagulantes vegetais se mostram uma alternativa viável em virtude de apresentam a vantagem de serem facilmente produzidos de forma artesanal e contribuírem para o aproveitamento total de alimentos, o que leva à redução do resíduo alimentar. A espécie *Morinda citrifolia* L., pertencente à família Rubiaceae, é popularmente conhecida como noni e se origina do sudeste da Ásia, sendo utilizada há mais de 2000 anos pelos polinésios como medicamento. Em virtude da propriedade antioxidante presente nas folhas, frutos e raízes, semelhante à da vitamina E, o noni é utilizado como conservante natural, já o suco do fruto, em reação com bactérias lácticas, possui um potencial probiótico. O objetivo deste trabalho foi detectar e caracterizar a atividade coagulante de leite da protease extraída do extrato bruto de sementes de noni. Foram avaliados os efeitos da temperatura, do pH e da concentração de sais na atividade coagulante do leite. O resultado confirmou a presença de uma protease constitutiva no extrato bruto de sementes de noni, com atividade coagulante tendo 65°C como temperatura ótima, em pH 4 e concentração ideal de CaCl₂ a 10mM. A caracterização da atividade coagulante de leite da protease presente no extrato bruto de sementes de *Morinda citrifolia* sugere um promissor potencial biotecnológico como coagulante vegetal na indústria de laticínios.

Palavras-chave: noni; milk-clotting; Biotecnologia.

ABSTRACT

The first traces of the existence of cheese date back to approximately 3000 years BC. (before Christ), which makes it one of the oldest manufactured foods. Due to its nutritional and organoleptic characteristics, cheese has become one of the main foods processed by man since the time of cattle domestication. The fundamental step for the elaboration of cheese is milk coagulation, a process that consists of converting milk from a liquid state to gel and is also known as curds. The main enzyme used in the dairy industry is chymosin, a protease extracted from the fourth stomach of weaned calves. Proteases, also called peptidases, are degradative enzymes that catalyze the hydrolysis of peptide reactions in other proteins or peptides, releasing free amino acids or peptides of variable length. They have a wide range of applications in different industries; in food, they are mainly used in cheese production, as they act in the hydrolysis of milk proteins. Due to the decrease in the availability of lactating calf stomachs and the increase in cheese consumption, new coagulant alternatives are needed. Vegetable coagulants are a viable alternative because they have the advantage of being easily produced by hand and contribute to the total use of food, which leads to the reduction of food waste. The species *Morinda citrifolia* L., belonging to the Rubiaceae family, is popularly known as noni and originates from Southeast Asia, being used for over 2000 years by the Polynesians as a medicine. Due to the antioxidant property present in the leaves, fruits and roots, similar to that of vitamin E, noni is used as a natural preservative, while the fruit juice, in reaction with lactic acid bacteria, has a probiotic potential. The objective of this work was to detect and characterize the milk coagulant activity of the protease extracted from the crude extract of noni seeds. The effects of temperature, pH and salt concentration on milk clotting activity were evaluated. The result confirmed the presence of a constitutive protease in the crude extract of noni seeds, with coagulant activity having 65°C as optimal temperature, at pH 4 and ideal concentration of CaCl₂ at 10mM. The characterization of the milk coagulant activity of the protease present in the crude extract of *Morinda citrifolia* seeds suggests a promising biotechnological potential as a vegetable coagulant in the dairy industry.

Keywords: noni; milk-clotting; Biotechnology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 — Mecanismo de ação da quimosina	14
Figura 2 — Folha e fruto do noni	19
Figura 3 — Sementes de noni	19
Figura 4 — Detecção da atividade coagulante da protease presente no extrato bruto de sementes de noni	25
Figura 5 — Foto demonstrativa do efeito da concentração de cloreto de cálcio sobre a atividade coagulante da protease de sementes de noni.....	30

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 — Análise da atividade coagulante de leite no extrato bruto de sementes de noni	26
Gráfico 2 — Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade coagulante da protease de sementes de noni	27
Gráfico 3 — Avaliação da estabilidade da protease presente no EB em diferentes temperaturas	27
Gráfico 4 — Avaliação do efeito do pH sobre a atividade coagulante da protease de sementes de noni.....	28
Gráfico 5 — Avaliação da estabilidade da enzima do EB de sementes de noni em diferentes pH.....	29
Gráfico 6 — Avaliação do efeito da concentração de cloreto de cálcio sobre a atividade coagulante da protease de sementes de noni.....	30
Gráfico 7 — Avaliação do efeito da concentração de cloreto de sódio sobre a atividade coagulante da protease de sementes de noni.....	31

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumina de soro bovino)
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
EB	Extrato Bruto
HCl	Ácido Clorídrico
M	Molaridade
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MCA	Milk-clotting activity (Atividade coagulante de leite)
Met	Metionina
µg	Micrograma
mg	Miligrama
µL	Microlitro
mL	Mililitro
Mm	Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetro
pH	Potencial Hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina
PVP	Polivinilpirrolidona
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UIBBM	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
US	Unidade Soxhlet
V _{max}	Velocidade Máxima da reação
Xg	Força Centrífuga Relativa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	A fabricação de queijo.....	13
1.2	Proteases e suas aplicações.....	15
1.3	Proteases vegetais	17
1.4	A planta <i>Morinda citrifolia</i>	18
1.5	Aplicações da espécie <i>Morinda citrifolia</i>	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo geral.....	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	211
3.1	Obtenção de material vegetal	22
3.2	Extração de proteínas vegetais.....	22
3.3	Dosagem de proteínas.....	22
3.4	Detecção de atividade coagulante de leite	22
3.5	Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade coagulante.....	23
3.6	Avaliação do efeito do ph sobre a atividade coagulante.....	24
3.7	Efeito da concentração ideal de sais sobre a atividade coagulante.....	24
3.8	Ensaio de atividade coagulante para determinação da estabilidade da enzima do extrato bruto de sementes de noni em diferentes temperaturas	24
3.9	Ensaio de atividade coagulante para determinação da estabilidade da enzima do extrato bruto de sementes de noni em diferentes pH.....	25
4	RESULTADOS	25
4.1	Detecção de atividade coagulante no extrato bruto de sementes de noni.....	255
4.2	Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade coagulante da protease de sementes de noni.....	26
4.3	Avaliação do efeito do ph sobre a atividade coagulante da protease de sementes de noni	28
4.4	Avaliação do efeito da concentração de sais sobre a atividade coagulante da protease de sementes de noni	29
5	DISCUSSÃO	31
6	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	366

1 INTRODUÇÃO

1.1 A fabricação de queijo

Leite é o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições higiênicas, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas, que apresenta como característica ser um líquido branco opalescente homogêneo, conforme definição da Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2011). Trata-se de uma emulsão natural composta por 87,30% de água, 4,90% de lactose, 3,80% de gordura, 3,30% de proteínas e 0,72% de minerais (SGARBIERI, 2004). Em 2018, a produção mundial leiteira foi de aproximadamente 843 bilhões de litros, desses, cerca de 30% destinaram-se à fabricação de queijos (DE PAULA et al., 2009; CORDEIRO DA SILVA, 2019).

Os primeiros traços da existência do queijo remetem há aproximadamente 3000 anos a.C. (antes de Cristo), o que faz dele um dos alimentos manufaturados mais antigos. Não se sabe ao certo exatamente quando a fabricação do queijo começou, mas acredita-se que seja fruto da domesticação de cabras e ovelhas. Por suas características nutricionais e organolépticas, o queijo se tornou um dos principais alimentos processados pelo homem a partir da época da domesticação de bovinos (EGITO & LAGUNA, 2006). De acordo com o MAPA, no Brasil, a população consome 4 quilos de queijo *per capita* por ano, em média. Cerca de 745 mil toneladas de queijo foram produzidas em 2010, a maior parte sendo destinada para consumo interno, e em uma década, a produção queijeira no país aumentou cerca de 86% (BRASIL, 2015).

A etapa fundamental para a elaboração do queijo é a coagulação do leite, processo que consiste na conversão do leite em estado líquido para gel e também é conhecido como coalhada. A coagulação ocorre através de acidificação ou por ação enzimática e decorre de modificações físico-químicas nas micelas de caseína, que vem a ser uma família de fosfoproteínas sintetizadas pela glândula mamária. A coagulação ácida se dá por meio da adição direta de ácidos orgânicos ao leite ou mediante produção de ácido láctico pelas bactérias do fermento, sendo, portanto, obtida por via biológica. A coagulação enzimática, usada em cerca de 75% do total dos queijos produzidos, é realizada em virtude da adição de enzimas específicas, que podem ser oriundas de animais, vegetais e/ou de microrganismos, podendo ser usadas misturadas entre si ou isoladamente. As enzimas obtidas do quarto estômago de ruminantes (abomaso) recebem o nome de coalho, por exemplo, coalho bovino, já a denominação coagulante é reservada a todas as enzimas obtidas por meio diferente do coalho, por exemplo, coagulantes vegetais e microbianos (DE PAULA et al., 2009; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011; GAJO et al., 2012; LEITE, 2016).

O método de coagulação enzimática pode ser dividido em fases. Na fase primária ou enzimática, ocorre a adição de enzimas proteolíticas que realizam a hidrólise da k-caseína. Em seguida, na fase secundária ou de agregação micelar, transcorre a agregação das micelas alteradas de caseína, formando a coalhada, que possui a aparência de um gel. Esse gel de coalhada possui bastante estabilidade, tendo condições de sofrer ações externas, como quebra e corte, contudo apresenta sinérese, que é a expulsão espontânea do soro, sendo essa a fase final de coagulação (DE PAULA et al., 2009; NEVES, 2014).

A principal enzima utilizada na indústria dos laticínios é a quimosina, protease extraída do abomaso de bezerros desmamados que atua na coagulação do leite, estando presente na fabricação da maior parte dos queijos (KLOOSTERMAN, 1991; HASHIM et al, 2011). O coalho bovino apresenta uma composição misturada de quimosina e pepsina, cujas proporções variam de acordo com a idade e o regime alimentar do animal; em bezerro recém-nascidos, a quimosina tem proporção média de 80% e a pepsina de 20%, essa proporção se torna inversa em animais mais velhos (GAJO et al., 2012). A relevância dessa proporção se deve ao fato de que quimosina apresenta maior grau de especificidade quando comparada à pepsina, fazendo com que aquela possua as propriedades ideais para o processo de coagulação, que são: alta atividade específica sobre a caseína, hidrolisando apenas a ligação peptídica Fenilalanina¹⁰⁵-Metionina¹⁰⁶ (Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶) da proteína (Figura 1), e baixa atividade proteolítica, cuja influência se dá nas características sensoriais do queijo, provocando modificações indesejáveis na textura, o que compromete a consistência dos queijos, e o desenvolvimento de sabores amargos durante a maturação (RAO et al., 1998; KUMAR et al., 2005; GAJO et al., 2012; MACHADO, 2013).



Figura 1 — **Mecanismo de ação da quimosina.** A quimosina quebra a ligação peptídica da k-caseína apenas na posição dos aminoácidos Fen¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ da proteína, produzindo dois peptídeos chamados para-k-caseína e macro peptídeo. Fonte: Próprio autor, baseado em FOLGADO (2019).

1.2 Proteases e suas aplicações

As proteases, também chamadas de peptidases, são enzimas degradativas que catalisam a hidrólise de reações peptídicas em outras proteínas ou peptídeos, liberando aminoácidos livres ou peptídeos de tamanho variável. As enzimas proteolíticas constituem um grupo bastante complexo e grande, diferindo em propriedades como pH e temperatura ótimos, sítio ativo e mecanismo catalítico, perfil de estabilidade e especificidade de substrato, além disso, são a única classe de enzima que ocupa uma posição central no que se refere às suas aplicações nos campos fisiológico e comercial (RAO et al., 1998; SUMANTHA et al., 2006; SILVA-LOPEZ, 2010).

De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM), as proteases pertencem à classe enzimática 3 (hidrolases), subclasse 3.4 (peptidases) e podem ser divididas em endopeptidases e exopeptidases, quando se considera o sítio de ação específico; as primeiras, também chamadas de proteinases, hidrolisam ligações peptídicas internas, já as segundas, hidrolisam ligações N-terminais ou C-terminais, sendo denominadas amino- ou carboxi-peptidases, respectivamente. As exopeptidases atuantes no N-terminal liberam um único resíduo de aminoácido, um dipeptídeo ou um tripeptídeo, enquanto que as que atuam em um C-terminal, um único resíduo ou um dipeptídeo (BARRETT, 1994; GOMES, 2004; RAWLINGS et al., 2006; DOS SANTOS et al., 2017).

Ainda de acordo com o UIBBM, as exopeptidases e as endopeptidases possuem subclassificações quanto à natureza do sítio catalítico e ao aminoácido liberado na catálise. As carboxipeptidases são subdivididas em serina, metalo e cisteína-peptidases. As endopeptidases são subdivididas em serina, cisteína, aspártico, metalo e treonina-peptidases. Os subgrupos recebem seus nomes do aminoácido crítico para a catálise, exceto no caso das metalopeptidases, que dependem de um ou dois íons metálicos para realizar essa função (DOS SANTOS et al., 2017).

As proteases são largamente comercializadas por várias empresas ao redor do mundo, sendo detentoras da maior parcela de vendas de enzimas industriais, e possuem uma ampla diversidade de aplicações em diferentes indústrias, como alimentícia, farmacêutica, cosmética, entre outras (SUMANTHA et al., 2006; ARAÚJO, 2020). Do total de enzimas produzidas pelos setores de alimentação e detergentes da indústria mundial, 60% é representado pelas proteases, evidenciando sua grande importância no campo comercial (TREMACOLDI, 2009). Além das múltiplas aplicações nos mais variados setores industriais, o uso de proteases, em substituição dos métodos químicos tradicionais, apresenta diversas

vantagens, como a economia de água, energia, produtos químicos, redução do custo no tratamento de efluentes e a minimização do impacto ambiental, já que os processos enzimáticos não são tóxicos (DOS SANTOS et al., 2017).

Com um valor estimado de U\$ 1,4 bilhão, a indústria de alimentos é a maior contribuinte do mercado de enzimas (ARAÚJO, 2020). Nesse setor, as proteases vêm sendo usadas para melhorar o crescimento de leveduras e o valor nutricional dos alimentos, aprimorar as propriedades nutricionais, funcionais e de sabor das proteínas e na redução da lactose e modificação do sabor em aplicações lácteas, entre outros (SUMANTHA et al., 2006). Afora isso, elas são empregadas na panificação, fabricação de queijos, amaciantes para carnes e preparação de hidrolisados de soja (RAO et al., 1998).

Conforme observado por Dos Santos e colaboradores (2017), dentre todas as aplicações alimentícias, a maior utilização de proteases se dá na coagulação para fabricação de queijos. Dentre as proteases utilizadas, a quimosina é o coalho mais estabelecido, contudo, coagulantes microbianos, vegetais e recombinantes se sobressaem como alternativas atrativas nos processos de produção de queijos, uma vez que conferem características diferenciadas a estes e apresentam maior disponibilidade (LIMA et al., 2018). Essas alternativas são necessárias em função da diminuição da disponibilidade de estômagos de bezerros lactantes e do aumento do consumo de queijos (PEREIRA et al., 2010).

Entre os grupos de micro-organismo capazes de gerar proteases, os fungos têm sido largamente utilizados, pois suas enzimas geralmente são extracelulares, facilitando o processo de extração e recuperação do meio de fermentação, operação através da qual as proteases são produzidas por esses grupos (DA SILVA, 2013). As enzimas proteolíticas de origem microbiana promovem a coagulação do leite de forma semelhante à da caseína, clivando a ligação peptídica Phe105-Met106 da κ -caseína (FARSHAD et al., 2013; SILVA et al., 2014). A atração dos micro-organismos como fonte de proteases se dá pela possibilidade de cultivo em grandes quantidades e em um espaço de tempo relativamente curto (NEVES, 2014). Muitos estudos têm sido realizados sobre as espécies que são fontes de peptidases de origem microbiana, dentre elas *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* (CLAVERIE-MARTIN; VEGA-HERNANDEZ, 2007), *Termomucor indicae-seudaticae* (MERHEB-DINI et al., 2012), *Termitomyces clypeatus* (MAJUMDER et al., 2015), *Thermoascus aurantiacus* (MERHEB et al., 2007) e *Bacillus sp* (SHIEH; THI; SHIH, 2009; LEMES et al., 2016).

Quanto à utilização de vegetais como fonte de proteases, seu uso depende de vários fatores, como a adequação das condições climáticas para o crescimento da planta e a disponibilidade de terra para cultivo (RAO et al., 1998). Contudo, sua principal vantagem está no fato de que produtos de origem natural são mais facilmente aceitos e aprovados para comercialização quando comparados com os obtidos por algum tipo de manipulação genética (EGITO & LAGUNA, 2006). Especialmente no que se refere ao emprego dessas peptidases

na coagulação de leite, grande interesse tem sido despertado em decorrência da facilidade de obtenção de extratos, da agregação de valor nutricional ao produto e a facilidade na purificação e/ou isolamento do coagulante natural (DE FARIAS, 2016). Dentre as espécies vegetais com peptidases estudadas, destacam-se *Oryza sativa* (ASAKURA et al., 1997), *Cucumis melo* (UCHIKOBA, T., KANEDA, 1996) e *Ananas comosus* (CATTANEO et al., 1994), dentre outras.

1.3 Proteases vegetais

As proteinases das plantas são responsáveis por um conjunto de reações enzimáticas essenciais à vida que constituem o metabolismo proteico (LOPES et al., 2017). Elas participam de diversas atividades das plantas, como a liberação de aminoácidos nos órgãos de reserva, regulação do apoptose, fotossíntese e expressão gênica (XAVIER-FILHO, 1992; SOLOMOM et al., 1999; ADAM, 2000; ESTELLE, 2001). Além disso, atuam no mecanismo de defesa pré-formado das plantas, de modo que algumas proteases são produzidas antes mesmo que haja um ataque do patógeno (TREMACOLDI, 2009).

Das proteases de origem vegetal utilizadas na indústria, se destacam: a papaína, utilizada na indústria medicinal, cervejeira, de sucos e carne, obtida da *Carica papaya*; a bromelina, com diversas aplicações medicinais, extraída de *Ananas comosus*; e a ficina, com a mesma aplicação industrial da papaína, retirada da *Ficus glabra* (EGITO & LAGUNA, 2006). Na indústria farmacêutica, as proteases vegetais são utilizadas no preparo de colágenos hidrolisados e na produção de fármacos usados, por exemplo, no tratamento de feridas, inflamações e distúrbios digestivos. Na indústria alimentícia, estão presentes na fabricação de queijos, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, na clarificação de cervejas, no amaciamento de carnes, entre outros. Além do mais, também são usadas na produção de detergentes e para amaciamento de fibras nas indústrias têxteis (FRANÇA-SANTOS et al., 2009).

Uma vantagem do uso de proteases vegetais está relacionada com o aproveitamento total de alimentos. O não aproveitamento de alimentos promove um grande impacto negativo no meio ambiente, uma vez que a deposição inadequada de lixo alimentar no solo apresenta consequências danosas, tais como o odor proveniente da putrefação da matéria orgânica e a formação do chorume, que pode atingir os rios e lençóis freáticos. Uma solução para este problema é a utilização completa dos alimentos, especialmente frutas e vegetais, que além de proporcionar um melhor consumo nutricional, pode trazer crescimento para a economia relacionada aos alimentos e desenvolvimento para a relação ecológica entre o homem e o

meio ambiente em que vive, já que a redução de resíduo é a principal consequência desse aproveitamento (SAMPAIO; FERST; OLIVEIRA, 2017). Dessa forma, se proteases vegetais, que usualmente são obtidas de partes como frutas, raízes, látex e flores, forem extraídas, também, de partes não consumíveis, haveria uma possível diminuição do resíduo alimentar, oriundos da preparação da alimentação humana (VIANA et al., 2006; SCHMIDT, 2016).

Machado (2013) destaca que as proteases de origem vegetal podem substituir tanto o coalho de origem animal quanto a quimosina recombinante, visto que a utilização desses produtos tem sido questionada por diversas entidades reguladoras da indústria de laticínios em diferentes países. Os coagulantes de origem vegetal também apresentam a vantagem de serem facilmente produzidos de forma artesanal e apresentarem baixo custo, o que os torna uma alternativa econômica interessante (LAGUNA & EGITO, 2001). Além disso, para Schmidt (2016), os extratos das proteases vegetais possuem propriedades funcionais que são fundamentais para a definição da textura e do sabor dos produtos, o que possibilita aplicações inovadoras dessas proteases.

Assim, o interesse no uso de proteases vegetais como coagulantes vem crescendo de tal forma que, em alguns casos, se tornam preferíveis aos de origem animal. Países como Portugal, Espanha e Itália utilizam enzimas de origem vegetal para a fabricação de queijos artesanais (LAGUNA & EGITO, 2001). Esse interesse se reflete na busca por novas espécies que possam ser utilizadas como coagulantes de leite, como a *Morinda citrifolia*, que já teve sua atividade coagulante identificada na polpa do fruto e na semente (DE FARIAS, 2016; DE OLIVEIRA, 2021).

1.4 A planta *Morinda citrifolia*

A espécie *Morinda citrifolia* L., pertencente à família Rubiaceae, é popularmente conhecida como noni e se origina do sudeste da Ásia, sendo utilizada há mais de 2000 anos pelos polinésios como medicamento (WANG et al, 2002; LEMES et al, 2020).

A árvore pode chegar a uma altura entre 3 e 10 metros, com folhas simples esverdeadas, inflorescências brancas de pequeno porte e frutos ovais que alcançam até 10 centímetros de comprimento e 6 de largura (CORREIA et al, 2011; LEMES et al, 2020). O fruto do noni (Figura 2) tem como característica uma superfície grumosa coberta de segmentos com formatos poligonais castanhos e uma variação na coloração, indo do verde para o amarelo ou o branco opalescente quando maduros (McCLATHEY, 2002; WANG et al, 2002). A polpa é cremosa, carnosa e suculenta, apresentando sabor e aroma não muito agradáveis. Suas numerosas sementes, são marrons, com formatos triangulares a alongados, e medem entre 3 e 10 milímetros de comprimento (Figura 3) (VEIGA et al, 2005).



Figura 2 — Folha e fruto do noni. Fonte: Próprio autor



Figura 3 — Sementes de noni. Fonte: Próprio autor

1.5 Aplicações da espécie *Morinda citrifolia*

As partes mais utilizadas do noni são os frutos, seguido pelas raízes e folhas, sendo que a maioria do consumo se dá na forma de suco da fruta, porém as folhas e fruto também

são comercializados na forma de comprimidos e chás (PAWLUS; KINGHORN, 2007; BARBOSA et al, 2017).

No Havaí, a *Morinda citrifolia* é a segunda espécie de planta mais consumida pela população. Na Polinésia, ela é utilizada para tratar diversas doenças, tais como: queimaduras e feridas, irregularidades menstruais, artrite, hipertensão, diabetes, câncer e, ainda, como antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, dentre outros (BARBOSA et al, 2017).

Segundo esclarece Abou Assi e colaboradores (2015), a *M. citrifolia* possui diferentes aplicações na indústria. Em virtude da propriedade antioxidante presente nas folhas, frutos e raízes, semelhante à da vitamina E, o noni é utilizado como conservante natural (ZIN et al, 2002), já o suco do fruto, em reação com bactérias lácticas, possui um potencial probiótico (WANG et al, 2009). Além disso, estudos indicam que a *M. citrifolia* pode ser utilizada como inseticida verde e fonte natural de medicamentos e reagentes químicos (KOVENDAN et al., 2012; TONTRONG et al., 2012; SUMAN et al., 2013).

Por causa dos benefícios que estão relacionados ao seu consumo, o noni foi introduzido no Brasil com um forte apelo comercial, sendo o seu cultivo realizado em estados como São Paulo, Sergipe, Minas Gerais e Ceará, entre outros (PALIOTO et al, 2015). Entretanto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proíbe a comercialização de qualquer produto que contenha noni, conforme determina a Resolução RDC nº. 278/2005, mesmo havendo o desenvolvimento de estudos científicos sobre a *M. citrifolia*, pois considera que a fruta não possui histórico de consumo no país (PIMENTEL et al, 2016). Segundo Oliveira e colaboradores (2018), a ANVISA considera que a segurança dos produtos contendo noni é questionável uma vez que as evidências científicas dos efeitos sobre a saúde humana são limitadas.

De acordo com Mororó et al (2017), sobre os efeitos biológicos do noni

Consta na literatura a descrição de atividade anti-helmíntica (*Ascaridia galli*); efeitos protetores em lesão hepática; efeitos aditivos de indução de apoptose, pela via intrínseca; ação neuroprotetora (com o aumento na memória de curto e longo prazo); não possuindo efeito adverso sobre a fertilidade; as avaliações de genotoxicidade mostravam-se dentro dos limites normais e reversíveis; trabalhos não evidenciaram alterações histopatológicas em ratos com diabetes tipo I; também foi encontrado que não houve eficácia anti-inflamatória em mulheres com dismenorreia primária e alguns relatos mostraram que essa fruta possui certa hepatotoxicidade. (MORORÓ et al, 2017).

Contudo, mesmo com experimentos relatando diversos benefícios decorrentes do consumo de *M. citrifolia*, ainda existe a possibilidade da ocorrência de efeitos adversos como náuseas, dores epigástricas, edema, tosse, constipação ou diarreia, dores de cabeça e erupções cutâneas (PIMENTEL et al, 2016). Barbosa et al (2017) destaca que os estudos de

atividade biológica ou de toxicidade que utilizam o fruto em forma de suco ainda são poucos, tendo em vista que esta é a principal forma de consumo popular.

Dessa forma, com estudos bem delineados que avaliam a toxicidade do noni ainda sendo controversos e escassos, mais pesquisas devem ser realizadas, além da grande necessidade de estudos clínicos, visando garantir um consumo seguro (BARBOSA et al, 2017; MORORÓ et al, 2017; OLIVEIRA et al, 2018).

Diante do exposto, este trabalho tem por objetivo contribuir com as informações sobre proteases vegetais, encontrando uma fonte alternativa sustentável de protease coagulante a partir de sementes de *Morinda citrifolia*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Detectar e caracterizar proteases bioativas presentes nas sementes de *Morinda citrifolia*, avaliando sua atividade coagulante de leite.

2.2 Objetivos específicos

- Detectar atividade coagulante de leite no extrato bruto de sementes de *Morinda citrifolia*;
- Avaliar bioquimicamente o efeito da temperatura sobre a atividade coagulante da protease do extrato bruto de sementes de *Morinda citrifolia*;
- Avaliar bioquimicamente o efeito do pH sobre a atividade coagulante da protease do extrato bruto de sementes de *Morinda citrifolia*.
- Avaliar bioquimicamente a termoestabilidade da protease contida nas sementes de *Morinda citrifolia*.
- Avaliar bioquimicamente a estabilidade em diferentes pH da protease contida nas sementes de *Morinda citrifolia*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção de material vegetal

Os frutos de *Morinda citrifolia* foram coletados nos municípios do Rio de Janeiro e Campos dos Goytacazes, no Estado do Rio de Janeiro. Com o fruto consideravelmente maduro, as sementes foram colhidas e limpas de qualquer resíduo, sendo, então, secas em temperatura ambiente e depois pulverizadas em aparelho moedor para a obtenção do pó utilizado posteriormente para a extração de proteínas.

3.2 Extração de proteínas vegetais

As proteínas foram extraídas a partir do pó das sementes de noni ao qual foi acrescido 10% (referente ao peso fresco das sementes) de Polivinilpirrolidona (PVP). Em seguida, foi adicionada uma solução tampão de Tris-HCL 50 mM (pH 6), na proporção de 5:1 (5 ml de tampão de extração foram adicionados para cada grama de semente). A mistura resultante foi mantida por 1 hora e 30 minutos em agitação vigorosa, a 4°C e, em seguida, centrifugada a 12000 xg, a 4°C, por 30 minutos.

O sobrenadante foi coletado e denominado de extrato bruto proteico (EB), enquanto o sedimento resultante foi descartado.

3.3 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada conforme a metodologia desenvolvida por Bradford (1976) e referenciada pela curva padrão da proteína BSA.

Para a construção da curva padrão, foi distribuído em tubos de microcentrifuga 100 µg/µL de BSA Bradford Ultra™, nas concentrações individuais de 0 µg, 2 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg e 10 µg, às quais foram acrescidas água MilliQ a fim de completar o volume de 800 µL. Em cada tubo foi adicionado 200 µL do corante Bradford totalizando, assim, 1 mL.

Para a dosagem de proteína das amostras, diferentes volumes do EB foram utilizados, cujo resultado foi comparado com o obtido na curva padrão. Todas as amostras foram analisadas no espectrofotômetro a 595 nm.

3.4 Detecção de atividade coagulante de leite

O ensaio de detecção de atividade coagulante de leite foi realizado conforme o método desenvolvido por Arima et al (1970).

Leite desnatado (10% w/v) foi adicionado em tampão CaCl_2 (10mM) em pH 6,5. Novecentos microlitros dessa solução foram aliquotados em tubos de microcentrífuga, aos quais foram adicionados 100 μL de extrato bruto para iniciar o ensaio. Os tubos foram mantidos à 50°C, até que fossem percebidos os primeiros coalhos formados a partir da coagulação de leite (do inglês *clotting*), sendo esse tempo chamado então de “tempo de clotting” (t). Foram realizados três controles experimentais nas mesmas condições relatadas anteriormente. Para controle nulo, um tubo contendo 1000 μL da solução de leite foi incubado a fim de determinar se, em ausência de enzimas proteolíticas, haveria influência da temperatura na solução. Para controle positivo, em 950 μL da solução de leite foram acrescidos 50 μL de quimosina (Coagulante Líquido HA-LA®). Para controle experimental negativo, foi colocado em banho-maria 100 μL do tampão de extração (descrito no item 3.2) junto com 900 μL da solução de leite, com o objetivo de estabelecer se a solução tampão de Tris-HCl 50 mM (pH 6) poderia intervir na atividade coagulante do extrato bruto. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

Os resultados foram expressos na forma de unidade de coagulação de leite (MCA, “Milk Clotting Activity”), estabelecido como a quantidade de extrato bruto (mL) necessária para a coagulação de 100 mL de leite em 40 minutos, de acordo com as condições do ensaio. O MCA foi expresso em Unidade Soxhlet por mL de coagulante (US/mL) e calculado usando a seguinte equação:

$$MCA \text{ (US/mL)} = 2400 t \times S E$$

Onde:

t = tempo de *clotting* (seg);

S = volume de substrato (mL);

E = volume de solução enzimática (EB) (mL).

3.5 Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade coagulante

Para a avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da protease contida no EB foi utilizada a metodologia descrita no item 3.4 com algumas modificações. Os ensaios de coagulação do leite, realizados em diferentes temperaturas (30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 e 90°C). Os experimentos foram conduzidos em triplicatas, com MCA

calculado conforme apresentado no item 3.4 e resultados expressos em média \pm desvio padrão (DP).

3.6 Avaliação do efeito do pH sobre a atividade coagulante

Para a avaliação do efeito do pH sobre a atividade enzimática da protease contida no EB foi utilizada a metodologia descrita no item 3.4 alterando-se o pH do tampão de ensaio, incubado na temperatura ideal da protease. Os tampões utilizados foram: Citrato Fosfato (50mM) para os pH 3, 4, 4,5, 5, 5,5 e 6; Fosfato de Sódio (50mM) para os pH 6 e 7 e Tris-HCl (50mM) para os pH 8, 9 e 10. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas, com MCA calculado conforme apresentado no item 3.4 e resultados expressos em média \pm desvio padrão (DP).

3.7 Efeito da concentração ideal de sais sobre a atividade coagulante

Os efeitos da quantidade de sais na coagulação do leite foram detectados através de ensaios utilizando CaCl_2 e NaCl em diferentes concentrações (0, 10, 50, 100, 500 e 1000mM) adicionados individualmente ao tampão de ensaio contendo leite desnatado. Os ensaios foram realizados na temperatura ótima e tendo como tampão aquele do pH ideal encontrado conforme a metodologia descrita no item 3.6. Foi calculado o MCA para cada concentração de sal verificada e os resultados expressos em média \pm desvio padrão (DP).

3.8 Ensaio de atividade coagulante para determinação da estabilidade da enzima do extrato bruto de sementes de noni em diferentes temperaturas

Para determinação da estabilidade da enzima em diferentes temperaturas, foi incubado previamente 100 μL do EB nas temperaturas 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 e 90°C durante 30 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata e na temperatura, pH e concentração de sais ideais. Foi considerada como 100% a atividade da enzima ocorrida na sua temperatura ideal, comparando-a com a atividade nas demais temperaturas testadas no ensaio. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP).

3.9 Ensaio de atividade coagulante para determinação da estabilidade da enzima do extrato bruto de sementes de noni em diferentes pH

Para determinação da estabilidade da enzima quanto ao pH, foi incubado previamente 100 μ l do EB durante 60 minutos à 4°C em tampões com diferentes faixas de pH. Os tampões utilizados foram: Citrato Fosfato (50mM) para os pH 3, 4, 4,5, 5, 5,5 e 6; Fosfato de Sódio (50mM) para os pH 6 e 7 e Tris-HCl (50mM) para os pH 8, 9 e 10. Os ensaios foram realizados em triplicata e na temperatura, pH e concentração de sais ideais. Foi considerada como 100% a atividade da enzima ocorrida no seu pH ideal, comparando-a com a atividade nas demais faixas de pH testadas no ensaio. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP).

4 RESULTADOS

4.1 Detecção de atividade coagulante no extrato bruto de sementes de noni

O extrato bruto de sementes de noni foi avaliado quanto à atividade coagulante de leite da enzima presente nele, sendo submetido ao teste de coagulação. Observou-se a formação de coágulos de leite (Figura 4) na amostra contendo quimosina, controle positivo, (C) e na amostra com o extrato bruto (D). A atividade coagulante, calculada conforme equação descrita no item 3.4, não foi percebida nas amostras compostas pelo controle nulo e o controle negativo (Gráfico 1).

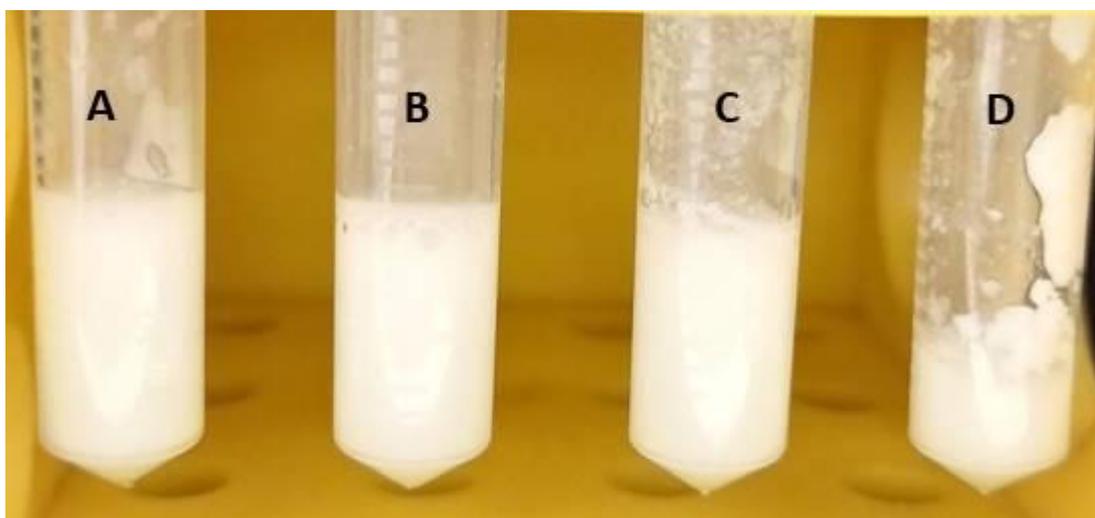


Figura 4 — **Detecção da atividade coagulante da protease presente no extrato bruto de sementes de noni.** Foto representativa de um dos resultados obtidos nos experimentos feitos em triplicata, sendo: (A) – Solução tampão (Leite desnatado 10% em CaCl₂ 10mM, pH 6,5), controle nulo; (B) - Solução

tampão incubada com 100 μL de tampão de extração (Tris HCl 50mM, pH 6), controle negativo; (C) - Solução tampão incubada com 50 μL de Quimosina, controle positivo; (D) - Solução tampão incubada com 100 μL de extrato bruto de sementes de noni. Fonte: Próprio autor.

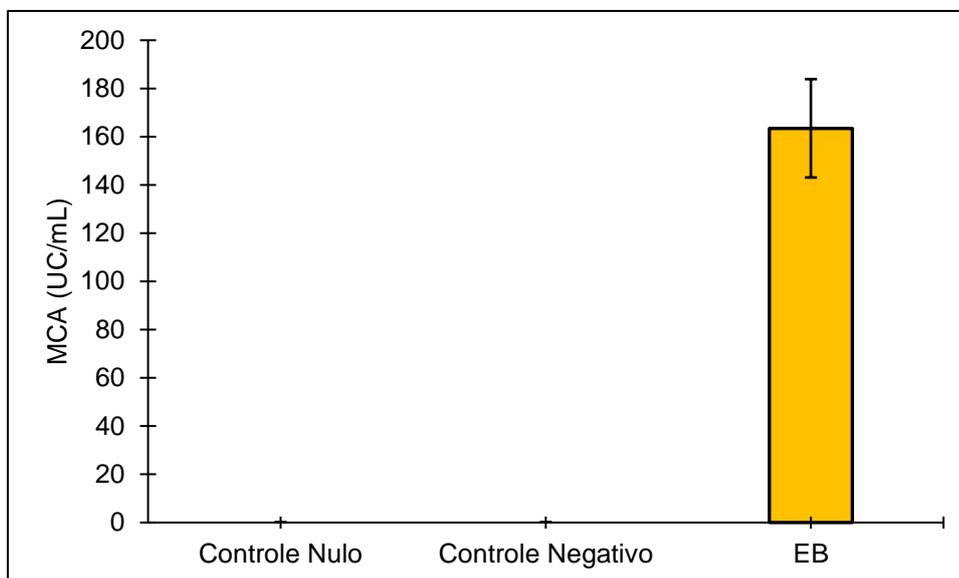


Gráfico 1 — **Análise da atividade coagulante de leite no extrato bruto de sementes de noni.** Cada barra representa a média de três experimentos independentes junto com a indicação de \pm desvio padrão. Os ensaios foram feitos a 50°C. Sem a presença do EB, não houve coagulação do leite. Fonte: Próprio autor

4.2 Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade coagulante da protease de sementes de noni

A avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade coagulante da protease presente no EB foi realizada em diferentes faixas de temperatura, variando entre 30°C e 90°C. Os resultados (Gráfico 2) mostraram que a atividade coagulante se iniciou em 40°C, com atividade relativa de 27%. Nas temperaturas entre 40°C e 50°C não houve grande variação no MCA, com valores pouco significativos. A partir de 60°C a atividade coagulante se tornou mais pronunciada, porém 65°C é a temperatura ótima para a coagulação, com MCA de aproximadamente 296 US/mL, por esse motivo, os experimentos foram posteriormente conduzidos a essa temperatura. A partir de 70°C nenhuma temperatura atingiu um efeito nulo e os valores se mantiveram superiores quando comparados com as temperaturas entre 40°C e 50°C.

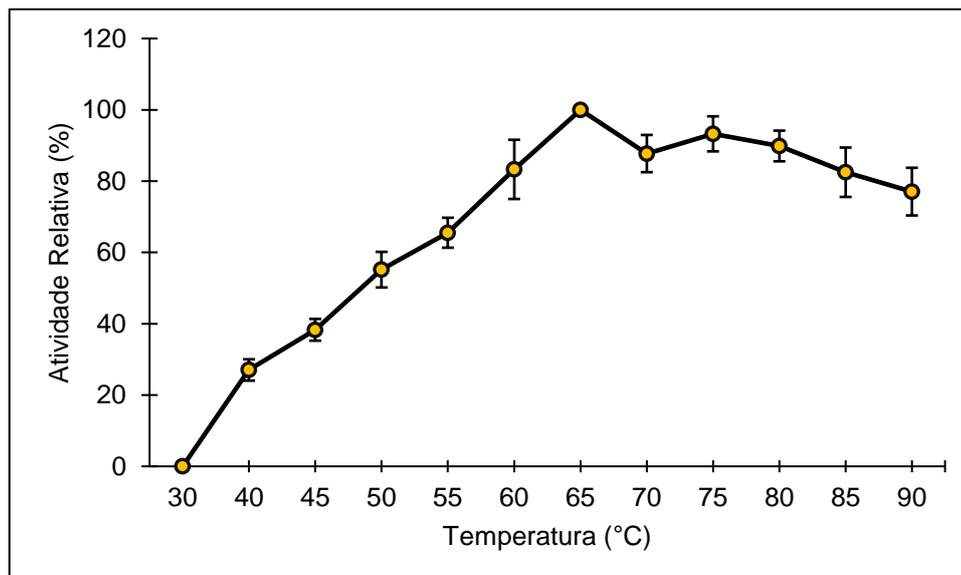


Gráfico 2— **Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade coagulante da protease de sementes de noni.** O efeito da temperatura na atividade coagulante do EB foi determinado utilizando solução tampão (Leite desnatado (10% w/v) em CaCl₂ 10mM, pH 6,5), entre 30°C e 90°C. A atividade relativa (100%) equivale ao valor atingido na temperatura em que a protease presente no EB de sementes de noni possui maior atividade coagulante. Cada ponto equivale à média de três experimentos independentes. As linhas partindo dos pontos representam o desvio padrão ($P < 0,05$). Fonte: Próprio autor.

Para a avaliação da estabilidade da enzima, alíquotas do EB foram incubadas em diferentes temperaturas, entre 30°C e 90°C, durante 30 minutos. A enzima demonstrou atividade coagulante entre 30°C e 55°C e inatividade a partir de 60°C, indicando que a protease não mantém sua estabilidade (Gráfico 3).

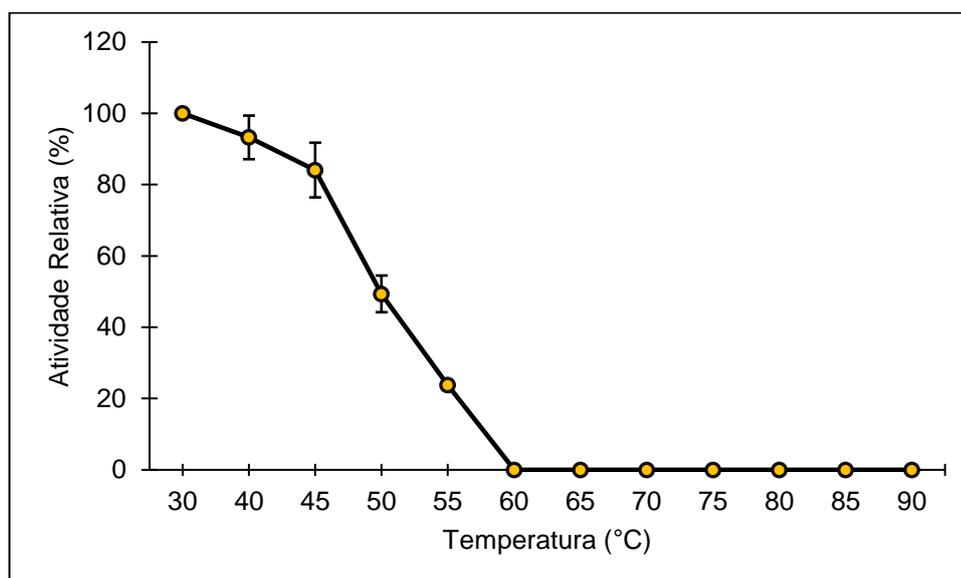


Gráfico 3 — **Avaliação da estabilidade da protease presente no EB em diferentes temperaturas.** A atividade relativa foi verificada com a incubação da enzima por 30 minutos em diferentes temperaturas entre 30°C e 90°C. Cada ponto equivale à média de três experimentos independentes,

realizados na temperatura, pH e concentração de sais ideais. As linhas partindo dos pontos representam o desvio padrão ($P < 0,05$). Fonte: Próprio autor.

4.3 Avaliação do efeito do pH sobre a atividade coagulante da protease de sementes de noni

A avaliação do efeito do pH sobre a atividade coagulante da protease presente no EB foi realizada em diferentes faixas de pH, variando entre 3 e 10, conforme é mostrado no Gráfico 4. A enzima apresentou atividade coagulante entre os pH 4 e 6, tendo como ótimo o pH 4. A atividade coagulante declinou em pH mais alcalinos, tendo uma redução de 38% em pH 6 e total inatividade em pH mais básicos.

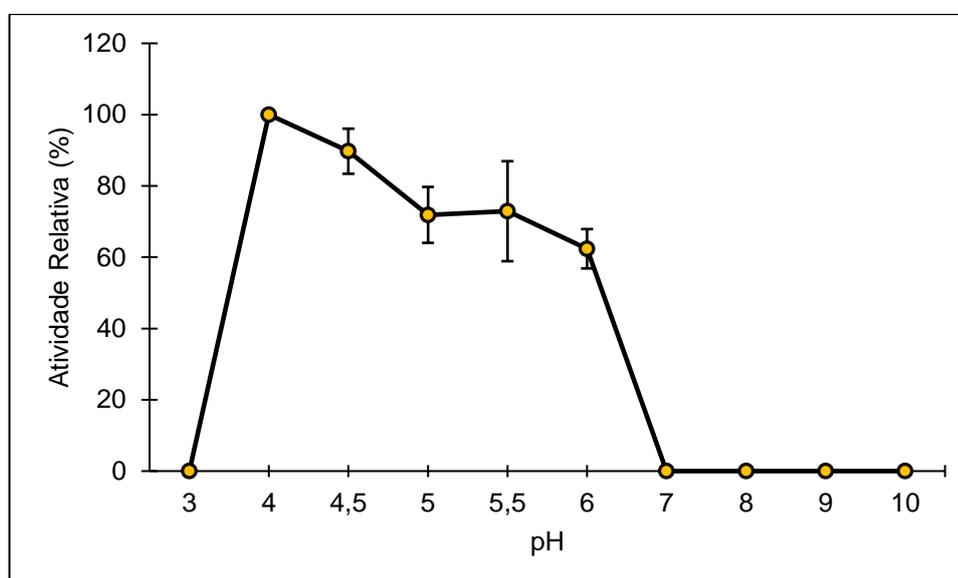


Gráfico 4 — **Avaliação do efeito do pH sobre a atividade coagulante da protease de sementes de noni.** O efeito do pH na atividade coagulante do EB foi determinado utilizando os tampões: Citrato Fosfato (50mM) para os pH 3, 4, 4,5, 5, 5,5 e 6; Fosfato de Sódio (50mM) para o pH 7 e Tris-HCl (50mM) para os pH 8, 9 e 10. Cada ponto equivale a média de três experimentos independentes. As linhas partindo dos pontos representam o desvio padrão ($P < 0,05$). Fonte: Próprio autor.

Para a avaliação da estabilidade da enzima quanto ao pH, alíquotas do EB foram incubadas em diferentes faixas de pH durante 60 minutos à 4°C. A enzima apresentou atividade coagulante entre os pH 4 e 6 (Gráfico 5). Com o pH 4 sendo considerado como 100% de atividade coagulante, houve um pequeno declínio dessa atividade a partir do pH 4,5. A atividade coagulante em pH 6 foi cerca de 77,37% da atividade máxima e a partir do pH 7 foi totalmente inativada.

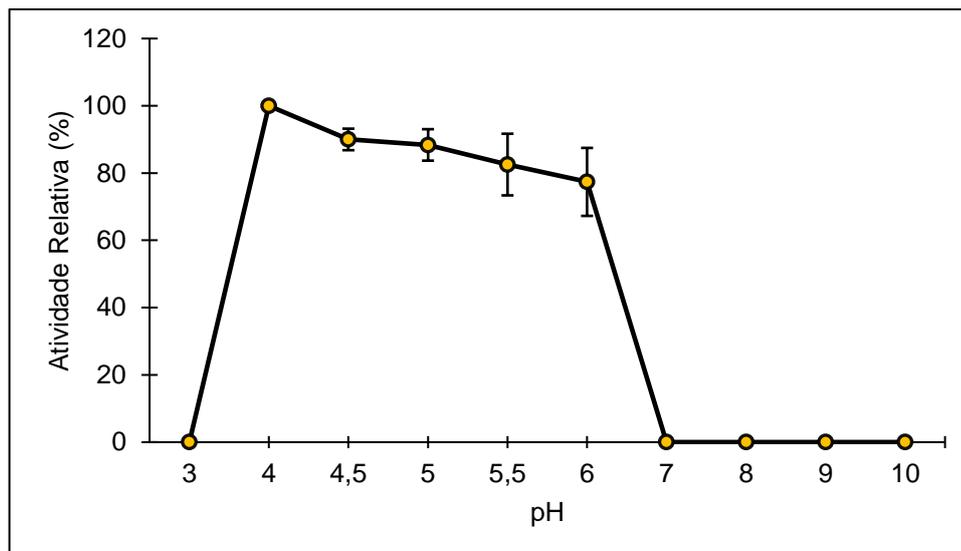


Gráfico 5 — **Avaliação da estabilidade da enzima do EB de sementes de noni em diferentes pH.** A atividade relativa foi verificada com a incubação da enzima por 60 minutos utilizando os tampões: Citrato Fosfato (50mM) para os pH 3, 4, 4,5, 5, 5,5 e 6; Fosfato de Sódio (50mM) para o pH 7 e Tris-HCl (50mM) para os pH 8, 9 e 10. Cada ponto equivale a média de três experimentos independentes, realizados na temperatura, pH e concentração de sais ideais. As linhas partindo dos pontos representam o desvio padrão ($P < 0,05$). Fonte: Próprio autor.

4.4 Avaliação do efeito da concentração de sais sobre a atividade coagulante da protease de sementes de noni

O efeito da concentração de sais sobre a atividade coagulante foi analisado em diferentes concentrações de cloreto de cálcio e cloreto de sódio. O Gráfico 6 mostra que a variação da concentração de CaCl_2 influenciou a coagulação de leite da protease presente nas sementes de noni. Sem a presença desse sal, a atividade residual diminuiu cerca de 40%, sendo 50mM a concentração onde a atividade máxima foi atingida com rendimento de 164,37%. Não houve variação significativa entre as concentrações de 100mM e 500mM e em 1M a atividade foi nula.

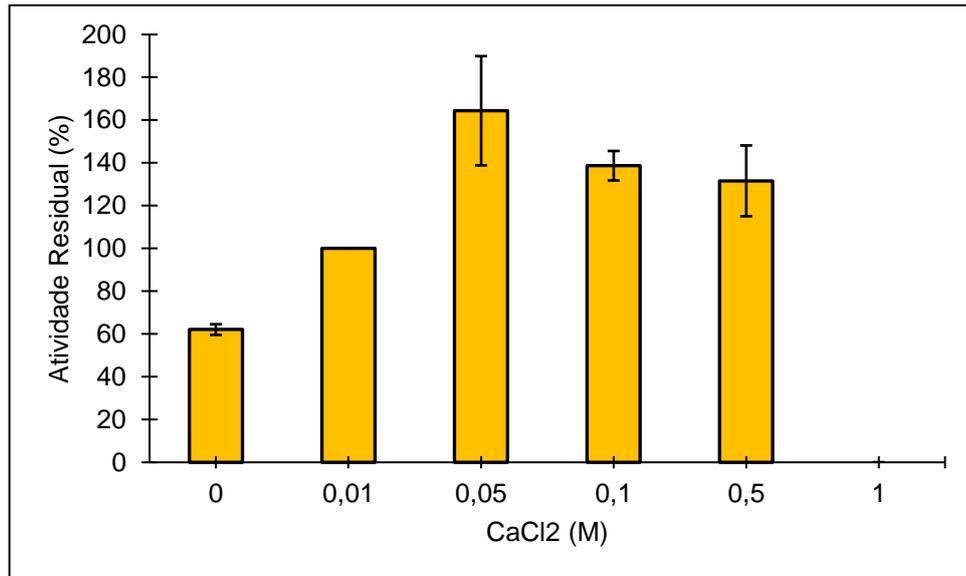


Gráfico 6 — **Avaliação do efeito da concentração de cloreto de cálcio sobre a atividade coagulante da protease de sementes de noni.** Efeito de diferentes concentrações (0M; 0,01M; 0,05M; 0,1M; 0,5M e 1M) de CaCl₂ na atividade coagulante do EB. Cada ponto equivale a média de três experimentos independentes, realizados na temperatura e pH ideais. As linhas partindo dos pontos representam o desvio padrão ($P < 0,05$). Fonte: Próprio autor.

Embora 50mM seja a concentração onde a atividade máxima foi atingida, ao analisar qualitativamente o coágulo formado, observou-se que 10mM é a melhor concentração, conforme mostra a Figura 5, por apresentar coágulos mais firmes, por esse motivo os experimentos continuaram a ser conduzidos com essa concentração.



Figura 5 — **Foto demonstrativa do efeito da concentração de cloreto de cálcio sobre a atividade coagulante da protease de sementes de noni.** (A) – Concentração de CaCl₂ 10mM; (B) - Concentração de CaCl₂ 50mM; (C) - Concentração de CaCl₂ 100mM; (D) - Concentração de CaCl₂ 500mM. Fonte: Próprio autor.

A atividade coagulante da protease do EB apresentou um decaimento conforme a concentração de sódio aumentou (Gráfico 7). Na concentração de 10mM, a atividade da enzima teve uma redução de 14% em comparação com a ausência de NaCl. O menor rendimento foi de 55,93% na concentração de 500mM e em 1M a atividade foi nula.

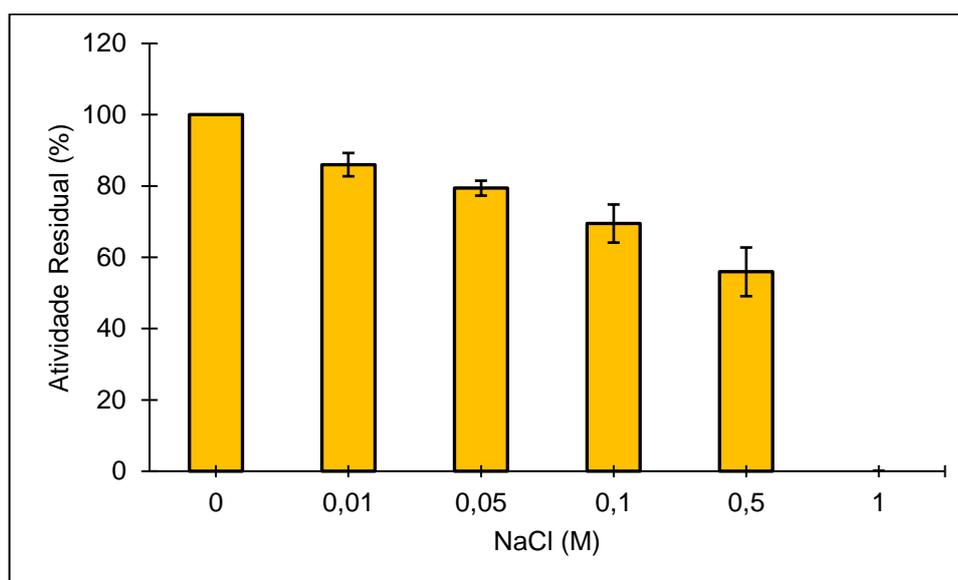


Gráfico 7 — Avaliação do efeito da concentração de cloreto de sódio sobre a atividade coagulante da protease de sementes de noni. Efeito de diferentes concentrações (0M; 0,01M; 0,05M; 0,1M; 0,5M e 1M) de NaCl na atividade coagulante do EB. Cada ponto equivale a média de três experimentos independentes, realizados na temperatura e pH ideais. As linhas partindo dos pontos representam o desvio padrão ($P < 0,05$). Fonte: Próprio autor.

5 DISCUSSÃO

Grande interesse tem sido despertado quanto ao uso de proteases vegetais como coagulante de leite, uma vez que elas são capazes de realizar atividade proteolítica mesmo em situações adversas, como diferentes amplitudes de pH e temperatura e na presença de agentes desnaturantes, tal característica demonstra sua potencialidade em substituir o coalho de origem bovina e a quimosina recombinante (CARVALHO 2013; DE OLIVEIRA, 2021).

Tendo em vista esse aumento na busca por coagulantes vegetais, neste estudo, as sementes de noni foram usadas como possível fonte de proteases coagulantes de leite. Os resultados da detecção e caracterização da atividade coagulante do extrato bruto de sementes de *Morinda citrifolia* demonstram seu potencial como alternativa de coagulante vegetal, como acontece com outras plantas cujas diferentes partes possuem proteases já descritas e identificadas, por exemplo, a flor de *Cynara cardunculus* L. (GUINÉ et al, 2019), a

folha de *Moringa oleifera* Lam (SHI et al, 2019), o látex da *Carica papaya* (DIOUF et al., 2012), e a semente de *Vellozia glabra* (GONZÁLEZ-VELÁZQUEZ et al, 2020).

A presença de uma protease coagulante de leite em partes de noni já foi descrita anteriormente por De Farias (2016) e De Oliveira (2021), sendo essas partes, respectivamente, a polpa do fruto e suas sementes. O presente trabalho teve como objetivo continuar as análises preliminares desenvolvidas pelo nosso grupo (DE OLIVEIRA, 2021), evidenciando a presença de uma protease com atividade coagulante de leite em sementes de noni. A atividade coagulante de leite foi observada com a presença do EB de sementes de noni, contudo, não foi percebida nas amostras compostas pelo controle nulo, contendo leite na ausência de proteases, e o controle negativo, com a presença do tampão de extração. Tal fato demonstra que os coágulos definitivamente são causados pela atividade da enzima proteolítica presente no extrato bruto, corroborando, por tanto, que a protease encontrada nas sementes de noni tem efeito sobre a caseína do leite. O MCA obtido pela protease das sementes foi de 163,47 US/mL, quando comparado ao da polpa, cujo valor é 174,5 US/mL (DE FARIAS, 2016), observa-se uma diminuição, porém, disso não decorre nenhuma insuficiência quanto à capacidade de coagulação.

A atividade máxima se apresentou em temperaturas mais elevadas, sendo a ótima 65°C, corroborando a informação encontrada por De Oliveira (2021), onde se obteve o MCA máximo (100%) de aproximadamente 296 US/mL. Outro exemplo de protease com ótimo em temperaturas elevadas é a presente no fruto de *B. pinguin*, descrita por Moreno-Hernández e colaboradores (2017), que apresentou coagulação máxima na faixa de 70-80°C. Tanto a protease das sementes de *Morinda citrifolia* quanto a do fruto de *B. pinguin* apresentaram baixos valores de MCA, sendo menos de 80 US/mL e 1 US/mL, respectivamente, na temperatura em torno de 32-37°C, faixa utilizada no processo de fabricação de queijo (CHITPINITYOL e CRABBE, 1998), contudo, isso não é um impeditivo para sua utilização como alternativas ao uso de coalhos de origem animal. Quanto à estabilidade, o extrato bruto das sementes de noni manteve atividade coagulante entre as temperaturas 30°C e 55°C, contudo, a perdeu em temperaturas mais elevadas, isso pode indicar uma possível desnaturação das proteínas presentes no EB, sendo necessários mais estudos para definir um motivo concreto, como a avaliação de quais proteases realizam a coagulação do leite. Comportamento semelhante foi encontrado nas proteases das flores de *Moringa oleifera*, que também foram inativadas em temperaturas entre 60°C e 70°C (PONTUAL et al., 2012) e na protease presente no látex da *Artocarpus altilis*, que apresentou redução na atividade coagulante à medida que a temperatura atingiu 80°C (SOARES et al, 2015).

Quanto ao pH, a enzima apresentou atividade coagulante entre os pH 4 e 6, tendo como ótimo o pH 4, e inatividade a partir do pH 7. Característica semelhante foi observada nas proteases de flores de *Moringa oleifera*, cuja maior atividade foi observada em pH 4

(CARVALHO 2013), na enzima do fruto da *Withania coagulans*, cuja alta atividade se encontra na faixa de pH 4,5 a 6,0 (SALEHI et al, 2017), e nas enzimas da *Cynara cardunculus*, que apresentam atividade entre pH 2 e 7, perdendo estabilidade em pH alcalino (MACHADO, 2013). Os resultados observados relacionados à atividade coagulante da protease de sementes de noni estão em concordância com as peptidases aspárticas, enzimas que possuem grande importância na indústria queijeira e que fazem parte de um dos quatro grupos de enzimas proteolíticas com atividade ótima em pH ácido, dentre elas, a quimosina, cujo pH ótimo varia entre 5,1 e 5,8 (DOMINGOS et al, 2000; KUMAR et al., 2010; MORENO & RAMOS, 2014). Nos ensaios de estabilidade para pH diferentes, a enzima apresentou atividade coagulante entre os pH 4 e 6, com o pH 4 sendo considerado ótimo, e inatividade a partir de pH 7, indicando a baixa estabilidade de pH.

Apesar de estabilidade térmica e de pH serem propriedades bioquímicas importantes que governam a escolha de enzimas utilizáveis em diversas aplicações biotecnológicas (LEITE, 2016), um coagulante que apresente estas características de forma elevada pode ter como resultado uma hidrólise excessiva das proteínas do leite, o que produzirá queijos com características comerciais indesejáveis, como um sabor amargo (LEMES et al., 2016; AHMED et al., 2009). Dessa forma a inativação da peptidase do EB de semente de noni em altas temperaturas e sua baixa estabilidade de pH podem evitar modificações nas propriedades organolépticas dos queijos.

A investigação do resultado de diferentes concentrações de CaCl e NaCl é justificada pela influência que a presença de íons de cálcio e sódio tem sobre a fabricação do queijo (AHMED et al., 2010). Quanto ao cloreto de cálcio, a atividade coagulante da protease das sementes de noni teve um aumento até atingir atividade máxima na concentração de 50mM e, após isso, houve uma tendência de declínio em concentrações maiores até alcançar a inatividade na concentração de 1M. Leite (2016), observou o mesmo resultado em proteases de laticíferas. Esse resultado demonstra como o íon cálcio possibilita maior agregação e formação de coágulos, pois atua neutralizando os resíduos negativos que se formam após a hidrólise das proteínas do leite, portanto, o CaCl₂ se comporta como um agente catalisador da enzima, tendo influência direta no tempo de coagulação (DINI et al., 2010; AHMED et al., 2010; LEITE, 2016). Quanto aos coágulos formados, com CaCl₂ na concentração de 500mM, a coagulação se inicia rapidamente, porém seu desenvolvimento foi o mais lento, apresentando um aspecto enfarinhado, assim como ocorreu com os coágulos formados na concentração de 100mM; em ambas as concentrações não houve uma distinção clara entre coágulo e soro. Na concentração de 50mM, os coágulos não se firmaram completamente, contudo se obteve uma distinção melhor entre soro e coágulo. Já a concentração de 10mM, apresentou coágulos mais firmes e que atingiram ponto de firmeza mais rapidamente, além de uma distinção claramente visível entre coágulo e soro. Tal fato pode ser explicado diante

de uma futura caracterização bioquímica completa e purificação da protease presente nas sementes de noni, uma vez que sua atividade coagulante de leite ainda não pode ser atribuída a uma classe de protease específica, em virtude da escassez de trabalhos sobre esta parte da planta.

A adição de NaCl mostrou possível influência no processo de coagulação, uma vez que, em sua presença, houve uma diminuição na atividade coagulante da protease das sementes de *Morinda citrifolia*, tal diminuição também foi observada na protease da polpa do noni (DE FARIAS, 2016), indicando que o aumento da força iônica possivelmente causou um efeito inibitório sobre a enzima (DINI et al., 2010). De acordo com Leite (2016), certas enzimas coagulantes podem ter sua atividade alterada ou inibida pela adição de íons Na^+ e Cl^- , uma vez que estes podem causar a diminuição da solubilidade da amostra levando à precipitação.

Devido à influência que o tipo de protease presente nos extratos vegetais exerce sobre o MCA (MAZORRA-MANZANO et al, 2013a), se faz necessária a realização de testes que visem a purificação do extrato bruto proteico das sementes de noni, a fim de avaliar a quantidade de proteases que desenvolvem a coagulação do leite. Vale salientar que a aplicação de proteases vegetais não se resume apenas à fabricação do queijo, conforme explicitado no item 1.3, de igual modo, a *Morinda citrifolia* possui vastas possibilidades de uso, dessa forma, é necessário que o estudo sobre seu potencial biotecnológico seja aprofundado.

6 CONCLUSÃO

Muito se sabe sobre as propriedades do noni, seja na forma de fruto ou de folhas, mas pouco se conhece à cerca das sementes. Este trabalho objetivou avaliar o potencial das sementes de *Morinda citrifolia* como coagulante vegetal, agindo como uma alternativa viável para o coalho de origem animal. Diante dos resultados apresentados, as propriedades da protease presente na semente de noni atestam seu potencial biotecnológico para aplicação na produção de queijo, fornecendo uma nova opção para a indústria de laticínios. A atividade proteolítica das sementes de noni precisa ser analisada, por isso, outros estudos que envolvam a purificação e caracterização da enzima presente no EB são necessários, assim, seu pleno uso biotecnológico, inclusive para outros fins, será elucidado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU ASSI, R. et al. *Morinda citrifolia* (Noni): A comprehensive review on its industrial uses, pharmacological activities, and clinical trials. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 5, p. 691-707, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.06.018>
- ADAM, Z. Chloroplast Proteases: Possible Regulators of Gene Expression. **Biochimie**. v.82, n.6-7, p.647-654, 2000.
- 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**, v. 43, p.759-764, 2010.
- ARAÚJO, F. J. D. S. **Avaliação de proteases e biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* TIM27 como aditivos em detergente**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.
- ARIMA, K.; YU, J; IWASAKI, S (1970). [30] Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. In: Methods in enzymology. **Academic Press**, v. 17, p. 446-459. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(70\)19033-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(70)19033-1)
- 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**, v. 45, p. 1070-1075, 1997.
- BARBOSA, A. F. et al. *Morinda citrifolia*: fatos e riscos sobre o uso do noni. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 119-249, 2017. <https://doi.org/10.5935/2446-4775.20170027>.
- BARRETT, A. J. Classification of peptidases. In: BARRETT, A. J. (ed). **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press. v.244, p.1-59, 1994.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011, Diário Oficial da União, Brasília, 29 de dezembro de 2011**, seção 1, página 6. Disponível em: <http://www.jusbrasil.com.br>
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Projeto de Melhoria da Competitividade do Setor Lácteo Brasileiro**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2015
- CATTANEO, T. M. P.; NIGRO, F.; MESSINA, G.; GIANGIACOMO, R. Effect of na enzymatic complex from pineapple pulp on the primary clotting phase. *Rennet Substitute* **Milchwissenschaft**, v.49, n. 5, 1994.
- CARVALHO, B.E.A. **Aplicação de proteases de flores de *Moringa oleifera* como coagulante na manufatura de queijo**. 2013. 56 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- CLAVERIE-MARTIN F, VEGA-HERNANDEZ MC Aspartic proteases in cheese making. In: Polaina J, Maccabe AP (eds) *Industrial enzymes*. Springer, Netherlands, pp 207–219, 2007.
- CHITPINITYOL, S.; CRABBE, M. J. C. Chymosin and aspartic proteinases. **Food Chemistry**, v. 61, p. 395-418, 1998. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00090-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00090-3).

CORDEIRO DA SILVA, Emanuel Isaque. Produção mundial de Leite em 2018: análise sobre o crescente aumento da produção e da produtividade. In: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco. **A nova pecuária leiteira mundial – produção mundial**, Campus Belo Jardim, PE: UFRPE, 2019.

CORREIA, A. A. S. et al (2011). Caracterização química e físico-química da polpa do noni (*Morinda citrifolia*) cultivado no estado do Ceará. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 22, n. 4, p. 609-615.

DA SILVA, Bruna Lima. **Produção e Caracterização da Protease Coagulante Obtida por Fermentação Submersa a Partir do Fungo Termofílico *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2013.

DE FARIAS, Vilmaria Albuquerque. **Peptidases cisteínicas do fruto noni (*Morinda citrifolia* L.) como agentes coagulantes de leite**. 2016. 103 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

DE OLIVEIRA, Julyanne Dantas. **Detecção da atividade de uma protease com potencial milk clotting em sementes de noni (*Morinda citrifolia*)**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

DE PAULA, Junio César J.; DE CARVALHO, Antônio F.; FURTADO, Mauro M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. *Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”*, Juiz de Fora: ILCT, v. 64, n. 367/368, p. 19-25, 2009.

DINI, C. M.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.D. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31). *Food Chemistry*, v.120, p.87-93, 2010.

DIOUF, L.; MALLAYE, A.; MBENGUE, M.; KANE, A.; DIOP, A. *Carica papaya* leaves: a substitute for animal rennet in cheese-making tradition. *Journal of Natural Product & Plant Resources*, v. 2, n. 4, p. 517-523, 2012.

DOMINGOS, A.; CARDOSO, P. C.; XUE, Z. T.; CLEMENTE, A.; BRODELIUS, P. E.; PAIS, M. S. Purification, cloning and autoprolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. *Eur JBiochem*, v. 267, p. 6824–6831, 2000.

DOS SANTOS, A. F. et al. Peptidases em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. **Biotecnologia Aplicada à Agro & Indústria: Fundamentos e Aplicações**. São Paulo: Editora Blücher, v. 4, p. 381-386, 2017.

EGITO, A.S.; LAGUNA, L.E. Produtos regionais derivados de leite de cabras e perspectivas de mercado para o Brasil. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 43, 2006, João Pessoa, PB. p.703-715, 2006.

ESTELLE, M. Proteases and cellular regulation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, v.4, n.3, p.252-260, 2001.

FARSHAD, K.; SOHEILAB, A.; FERAYDOON, M. Semi-purification and kinetic study of microfungus rennet biosynthesized by local isolate of *Rhizomucor nainitalensis* using solid-state fermentation system: Concentration methods and determinant factors in clotting activity. *European Journal of Experimental Biology*, Pelagia Research Library, 3(2):167-174P, 2013.

FOLGADO, A.; ABRANCHES, R. O cardo e a indústria de queijo: ferramentas biotecnológicas para a produção de enzimas utilizadas na coagulação do leite. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 3, p. 817-828, 2019.

FOOD INGREDIENTS BRASIL - Dossiê Enzimas: A evolução das enzimas coagulantes. Nº 16 - 2011. Disponível em <http://www.revista-fi.com/materias/164.pdf>. Acesso em: 06 dez 2022.

FRANÇA-SANTOS, A.; ALVES, R. S.; LEITE, N. S.; FERNANDES, R. P. M. (2011). Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi). **Scientia Plena**, Sergipe: Associação Sergipana de Ciência, v. 5, num. 11, 2009.

GAJO, A. A.; ABREU, L. R.; CARVALHO, M. S.; PAIXÃO, M. G.; PINTO, S. M.; DAVID, F. M. Estudo sensorial de queijo similar ao minas padrão com leite de ovelha utilizando coagulante coalho. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n.384, p. 61-65, 2012.

GOMES, C. E. M. **Purificação, caracterização e atividade bioinseticida de um inibidor de tripsina de sementes de *Crotalaria pallida***. 2004. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2004.

GONZÁLEZ-VELÁZQUEZ, D. A. et al. Exploring the Milk-Clotting and Proteolytic Activities in Different Tissues of *Vallesia glabra*: a New Source of Plant Proteolytic Enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03432-5>

GUINÉ, R. P. F.; FONTES, L.; LIMA, M. J. R. Cinética de secagem e propriedades de transferência de massa na secagem de flor de cardo. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, 2019. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.05119>

HASHIM, M. M. H.; IQBAL, M. F.; XIAOHONG, C.; MINGSHENG, B. Impact of processing conditions on the milk clotting activity of crude protease extracted from chinese ginger. **Internacional Conference on Food Engineering and Biotechnology**, v. 9, p. 327-335, 2011.

KLOOSTERMAN, J. The role of biotechnology in the manufacturing of wholesome natural ripened cheese. **Food Biotechnology**, v.5, n.3, p. 207-215, 1991.

KOVENDAN K.; MURUGAN K.; SHANTHAKUMAR, S.P.; VINCENT, S. Evaluation of larvicidal and pupicidal activity of *Morinda citrifolia* L. (Noni) (Family: Rubiaceae) against three mosquito vectors. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, n. 1, p. 362-369, 2012.

KUMAR, A.; GROVER, S.; SHARMA, J.; BATISH, V.K. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 04, p. 243 – 258, 2010.

LAGUNA, L. E. e EGITO, A.S. Atividade coagulante de extratos vegetais no leite integral de caprinos e bovino. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, p. 179 -185, 2001.

LEITE, H.B. **Aplicação de peptidases laticíferas para produção de queijo coalho vegetariano**. 2016. 84 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

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**, v. 66, p. 217-224, 2016.

LEMES, Isabella A. Atualização das evidências da *Morinda citrifolia* (NONI) na prática clínica. *Braz. J. Hea. Rev.*, Curitiba, v. 3, n. 4, p. 9991-10003 jul./aug. 2020. ISSN 2595-6825.

LIMA, A. D. da R.; FARIAS, V. A. de; OLIVEIRA, H. D. de. Prospecção Tecnológica de Patentes Relativas a Proteases na Produção de Queijos. **Cadernos de Prospecção**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 1726, 2018. DOI: 10.9771/cp.v11i5.27619.

LOPES, Miriam T. P.; SCHNAIDERMAN, Abraham V.; URIBE, Elsa; SALAS, Carlos E. Da planta ao medicamento: caso de estudo das proteinases de Caricaceae com atividade farmacológica. **Biociência Aplicada à Agro & Indústria: Fundamentos e Aplicações**. São Paulo: Editora Blücher, v. 4, p. 361-378, 2017.

MACHADO, M. H. F. **Produção de coalho líquido de cardo para aplicação industrial**. 2013. 72f. Dissertação de Mestrado – Universidade do Minho, Braga-Portugal, 2013.

MAJUMDER, R.; BANIK, S. P.; RAMRAKHIANI, L.; KHOWALA, S. Bioremediation by alkaline protease (akp) from edible mushroom *Termitomyces clypeatus*: optimization approach based on statistical design and characterization for diverse applications. **Journal Of Chemical Technology And Biotechnology**, v. 90, n. 10, p. 1886-1896, 2015.

McCLATHEY, W. From Polynesian healers to health food stores: changing perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). **Integ. Cancer Therapies**, v. 1, p. 110-120, 2002.

MERHEB, C. W.; CABRAL, H.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 127-131, 2007.

MERHEB-DINI, C.; GARCIA, G. A.C.; PENNA, A. L. B.; GOMES, E.; SILVA, R. Use of a new milk-clotting protease from *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 as coagulant and changes during ripening of Prato cheese. **Food Chemistry**, v. 130, p. 859- 865, 2012.

MORENO, I.; RAMOS, M. Bioseguridad del queso coagulado con quimosina transgénica en la Empresa de Productos Lácteos de Holguín, Cuba. **Revista Argentina De Bioseguridad** ISSN 2346-9374, p. 53, 2014.

MORENO-HERNÁNDEZ, J. M. et al. Exploring the milk-clotting properties of extracts from Bromelia pinguin fruit. *Journal of Microbiology*, **Biotechnology and Food Sciences**, v. 7, n. 1, p. 62-66, 2017. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017.7.1.62-66>

MORORÓ, Ana Virgínia T. P. et al. *Morinda citrifolia* (noni): uma revisão dos seus efeitos biológicos. **Revinter**, v. 10, n. 02, p. 46-61, jun. 2017.

NEVES, Kilma Cristiane Silva. **Produção de proteases coagulantes por espécies de *Pleurotus* em resíduos vegetais da Amazônia**. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.

OLIVEIRA, F. C. E. et al. Efeitos terapêuticos e adversos do noni (*Morinda citrifolia* L.) na saúde. **Revista Saúde & Ciência online**, v. 7, n. 3, (setembro a dezembro de 2018), p. 107-122.

PALIOTO, G. F. et al. Composição centesimal, compostos bioativos e atividade antioxidante de frutos de *Morinda citrifolia* Linn (noni) cultivados no Paraná. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1. https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_066

PAWLUS, A. D.; KINGHORN, D. A. Review of the ethnobotany, chemistry, biological activity and safety of the botanical dietary supplement *Morinda citrifolia* (noni). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2007; 59:1587-1609. ISSN: 2042-7158.

PEREIRA, S. C. et al. Utilização de proteases vegetais na fabricação de queijos coalho com leite de cabra. In: SIMPÓSIO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2, 2010, Aracaju. **Anais [...]** Aracaju: Universidade Federal de Sergipe, 2010. p. 1572-1575.

PIMENTEL, DD et al. Uso de Noni por pacientes oncológicos. **Revista Saúde e Ciência online**, 2016; v. 5, n. 1, p. 37-44.

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**, v. 135, p. 1848-1854, 2012.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 3, p. 596-635, 1998.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. D270-D272, 2006.

SALEHI, M.; AGHAMAALI, M. R.; SAJEDI, R. H.; ASGHARI, S. M.; JORJANI, E. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withania coagulans* fruit. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 847-854, 2017.

SAMPAIO, Iracilma; FERST, Enia; OLIVEIRA, Josimara. A ciência na cozinha: reaproveitamento de alimentos - nada se perde tudo se transforma. **Experiências em Ensino de Ciências**, Cuiabá, MT, v. 12, n. 4, p. 60-69, 2017.

SCHMIDT, Jéssica Tamiozzo. **Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo tofu utilizando coagulantes vegetais**. Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões Uri - Erechim, Erechim, 2016.

SGARBIERI, Valdemiro Carlos. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004. DOI: 10.1590/s1415-52732004000400001.

SHI, Y. et al. Proteomic analysis of *Moringa oleifera* Lam. leaf extract provides insights into milk-clotting proteases. **LWT**, v. 109, p. 289-295, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.035>

SHIEH, C.; THI, L. P.; SHIH, I. Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 85-91, 2009.

SILVA, B.L.; GERALDS, F.M.; MURARI, C.S.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and characterization of a milk-clotting protease produced in submerged fermentation by the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. **Appl. Biochem. Biotechnol**, 172: 2014, p. 1999-2011.

SILVA-LOPEZ, R. E.D. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Quím. Nova**. v. 33, n. 7, p. 1541-1548, 2010.

SOARES, E. F. et al. Potencial do latex da fruta pão (*Artocarpus altilis*) como agente coagulante do leite. **Ciência Rural**, Santa maria, v. 45, n. 1, p. 149-154, 2015. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140310>.

SOLOMON, M.; BELENGUI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEM, E.; LEVINE, A. The involvement of cysteine protease and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **The Plant Cell**. v.11, n.3, p.431-443, 1999.

SUMAN, T.Y.; RAJASREE, S.R. Radhika; KANCHANA, A.; BEENA, Elizabeth S. Biosynthesis, characterization and cytotoxic effect of plant mediated silver nanoparticles using *Morinda citrifolia* root extract. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 106, n.1, p. 74-78, 2013.

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. **Food Technology and Biotechnology**.v. 44, n. 2, p. 211, 2006.

TONTRONG, Sopa; KHONYOUNG, Supada; JAKMUNEE, Jaroon. Flow injection spectrophotometry using natural reagent from *Morinda citrifolia* root for determination of aluminium in tea. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 624-629, 2012.

TREMACOLDI, C. R. (2009). Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E).

UCHIKOBA, T.; KANEDA, M. Milk-clotting activity of cucumisin, a plant serine peptidase from melon fruit. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 325-330, 1996.

VEIGA, R. F. A. et al. Noni: frutífera medicinal em introdução e aclimação no Brasil. **O Agrônômico**, v. 57, p. 20-21, 2005.

VIANA et al. Resíduos alimentares do lixo domiciliar: Estudo do uso na alimentação de frangos de corte. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, PB v.10, n.1, p.203–211, 2006.

WANG, Mian-Ying et al. *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 23, n. 12, p. 1127-1141. PMID: 12466051, 2002.

WANG, Chung-Yi et al. Probiotic potential of noni juice fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, n. 6 p. 98-106, 2009.

XAVIER-FILHO, J. Sementes e suas defesas contra insetos. Projeto Multinacional de Biotecnologia e Alimentos Bioquímica e Biologia Molecular - controle Biológico de Pragas. Organização dos Estados Americanos - OEA. Imprensa Universitária, Universidade Federal do Ceará., Fortaleza, 1992.

ZIN, Z. Mohd; Abdul-Hamid, A; Osman, A. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. **Food Chemistry**, v. 78, n. 2, p. 227-231, 2002.