



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DETECÇÃO DE UMA PROTEASE COM ATIVIDADE MILK-CLOTTING EM EXTRATO
BRUTO DE FOLHAS DE CINAMOMO (*Melia azedarach*)

MARCIJANE AUZIER VINHOTE

RIO DE JANEIRO

2021

Marcijane Auzier Vinhote

DETECÇÃO DE UMA PROTEASE COM ATIVIDADE MILK-CLOTTING EM EXTRATO
BRUTO DE FOLHAS DE CINAMOMO (*Melia azedarach*)

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

2021

VINHOTE, Marcijane.

DETECÇÃO DE UMA PROTEASE COM ATIVIDADE MILK-CLOTTING
EM EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE CINAMOMO (*Melia azedarach*). 2021
50 f.

Monografia do Trabalho de Conclusão de Curso

Orientador: Prof. Dr. César Luis Siqueira Junior

1 – Proteínas 2 – Coagulantes 3 – Biotecnologia

I. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

II. Detecção de uma protease com atividade milk-clotting em extrato bruto de folhas
de cinamomo (*Melia azedarach*)

Marcijane Auzier Vinhote

DETECÇÃO DE UMA PROTEASE COM ATIVIDADE MILK-CLOTTING EM EXTRATO
BRUTO DE FOLHAS DE CINAMOMO (*Melia azedarach*).

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 ____ de _____

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

(Dra. Elisabete Fernandes Albuquerque Palermo – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro)

(Dra. Tânia Jacinto Freitas da Silva – Universidade Estadual do Norte Fluminense)

Dedico este trabalho à minha mãe, meus irmãos, meus sobrinhos, à memória do meu pai e à memória do meu irmão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, a pessoa mais importante da minha vida, por todo apoio e amor dedicados a mim. Agradeço também às minhas irmãs e meu irmão, pelo apoio, companheirismo e amizade ao longo da minha vida. Amo vocês!

Agradeço ao meu orientador Dr. César Luis, que me aceitou como aluna em seu laboratório e que ao longo desses anos sempre me incentivou, sempre disposto a ensinar e contribuiu muito para o meu crescimento acadêmico.

Agradeço à banca examinadora da minha monografia. Muito obrigada às doutoras Elisabete Palermo e Tânia Jacinto por terem aceitado participar e pela disponibilidade!

Agradeço aos meus sobrinhos e sobrinhas, por todo amor e carinho. Vocês enchem minha vida de alegria e sorrisos!

Agradeço à UNIRIO, aos funcionários e em especial a todos os meus professores, que contribuíram para a minha formação profissional.

Agradeço ao meu companheiro Caio, pelo apoio, companhia, compreensão e amor! Você é muito importante na minha vida.

Agradeço às minhas amigas especiais da UNIRIO: Luanni, Isabela, Júlia, Camille, Raquel e Daniela. Vocês foram muito importantes pra mim. Agradeço também aos demais amigos: Fernando, Marcelo, Phillipe, Victor Bergamin, Paulo de Tarso, Jean, Alessandra, Victor “Vaughan”. Obrigada pela amizade, companheirismo, conversas e risadas ao longo desses anos!

Agradeço aos amigos do NUPSA: Ana Carolina, Gustavo, Camilla, Stephane, Márcio, Renato, Gabi, Andreza e Duda. Obrigada pela acolhida ao laboratório, ensinamentos, paciência e amizade! Grata por toda a ajuda.

Agradeço aos amigos e colegas que conheci do curso Ciências Ambientais!

Quero agradecer algumas pessoas, entre amigos, parentes e conhecidos que de alguma forma me ajudaram ao longo desses anos de graduação: Renatinha, Tamara, Rose, Fran, Heloísa, Evellyn, Amália, Yara, Marina, Lúcia Cristina, Valéria, minha prima Giovana e à memória da minha prima Ocimar.

Agradeço à Deus, toda a minha família e todas as pessoas que fazem parte da minha vida!

RESUMO

Melia azedarach L. é uma espécie originária da Ásia, pertencente à família das meliáceas, conhecida popularmente no Brasil como cinamomo e possui propriedades bioativas utilizadas para fins terapêuticos. Por possuir potencial antiviral a espécie é citada dentre aquelas que podem auxiliar o sistema imunológico contra infecções por SARS-CoV-2, causador do covid-19. Em frutos da planta já foram descritas proteases cisteínicas, uma das classes de proteases vegetais empregadas na indústria alimentícia e medicinal. As proteases são enzimas catalisadoras da hidrólise de ligações peptídicas, nas quais proteínas são clivadas em aminoácidos ou peptídeos menores. Na indústria alimentícia, as proteases são fundamentais na produção de queijos, pois elas atuam na hidrólise de proteínas do leite. Para suprir a crescente demanda na produção mundial de queijos, busca-se constantemente novas enzimas coagulantes como forma de substituir a quimosina, uma protease extraída de bezerros e muito utilizada na fabricação de queijos. Novas alternativas de proteases coagulantes para a indústria alimentícia podem resultar em melhores produtos e os coagulantes vegetais tornam-se opções para alguns grupos de consumidores, além de melhorar os benefícios ambientais e contribuir para o desenvolvimento sustentável. O objetivo deste trabalho foi detectar e caracterizar a atividade proteolítica e coagulante de leite da protease extraída do extrato bruto de folhas de cinamomo. Foram avaliados os efeitos do pH e temperatura nas atividades proteolíticas e coagulantes do leite. Foram determinados os parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m), utilizando BANA como substrato e avaliado o efeito de sais na coagulação de leite. O resultado confirmou a presença de uma protease constitutiva no extrato bruto de folhas de cinamomo. A atividade coagulante da protease do extrato bruto foi maior em pH ácido à 50°C, concentração ideal de $CaCl_2$ a 50mM e apresentou alta estabilidade em ampla faixa de pH. Em temperaturas mais elevadas, a protease do EB perdeu atividade coagulante. O resultado da razão ACL/AP do extrato bruto de folhas de cinamomo foi significativo e apenas 3,5 vezes menor em comparação a quimosina. A elaboração de um queijo artesanal a partir da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo e a caracterização da atividade proteolítica e coagulante do leite sugerem promissor potencial biotecnológico da planta como coagulante vegetal para a indústria alimentícia.

Palavras-chave: Proteínas; Coagulantes; Biotecnologia.

ABSTRACT

Melia azedarach L. is a species originally from Asia, belonging to the meliaceae family, popularly known in Brazil as cinnamon and has bioactive properties used for therapeutic purposes. Due to its antiviral potential, the species is mentioned among those that can help the immune system against infections caused by SARS-CoV-2, which causes covid-19. Cysteine proteases have already been described in plant fruits, one of the classes of plant proteases used in the food and medicinal industry. Proteases are enzymes that catalyze the hydrolysis of peptide bonds, in which proteins are cleaved into amino acids or smaller peptides. In the food industry, proteases are essential in the production of cheese, as they act in the hydrolysis of milk proteins. To meet the growing demand in world cheese production, new coagulant enzymes are constantly being sought as a way to replace chymosin, a protease extracted from calves and widely used in cheese making. New alternatives of coagulant proteases for the food industry can result in better products and vegetable coagulants become options for some consumer groups, in addition to improving environmental benefits and contributing to sustainable development. The objective of this work was to detect and characterize the proteolytic and milk coagulant activity of the protease extracted from the crude extract of cinnamon leaves. The effects of pH and temperature on milk proteolytic and coagulant activities were evaluated. The kinetic parameters (V_{max} and K_m) were determined using BANA as a substrate and the effect of salts on milk coagulation was evaluated. The result confirmed the presence of a constitutive protease in the crude extract of cinnamon leaves. The coagulant activity of the crude extract protease was higher at acidic pH at 50 ° C, ideal concentration of $CaCl_2$ at 50mM and showed high stability over a wide pH range. At higher temperatures, the protease lost clotting activity. The result of the ACL / AP ratio of the crude extract of cinnamon leaves was significant and only 3.5 times lower compared to chymosin. The elaboration of artisanal cheese from protease from the crude extract of cinnamon leaves and the characterization of the milk's proteolytic and coagulant activity suggest a promising biotechnological potential of the plant as a vegetable coagulant for the food industry.

Keywords: Proteins; Coagulants; Biotechnology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: <i>Melia azedarach</i>	16
Figura 2: Frutos amarelos maduros do cinamomo.....	17
Figura 3: Frutos verdes do cinamomo.....	17
Figura 4: Classificação de peptidases.....	19
Figura 5: Mecanismo de ação da quimosina.....	20
Figura 6: Folhas de cinamomo.....	24
Figura 7: Avaliação da atividade proteolítica no extrato bruto de folhas de <i>M.Azedarach</i>	30
Figura 8: Análise da atividade coagulante de leite das proteínas contidas no extrato bruto de folhas de cinamomo.....	31
Figura 9: Foto demonstrativa do processo de coagulação do leite pela protease do extrato bruto de folhas de cinamomo.....	31
Figura 10: Avaliação do efeito do pH sobre a atividade proteolítica da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo.....	32
Figura 11: Avaliação da estabilidade da atividade proteolítica da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo em diferentes pHs.....	33
Figura 12: Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo.....	34
Figura 13: Avaliação da estabilidade da atividade proteolítica da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo em diferentes temperaturas.....	35
Figura 14: Avaliação do efeito do pH sobre a atividade coagulante de leite da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo.....	36
Figura 15: Avaliação da estabilidade da atividade coagulante de leite da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo em diferentes pHs.....	37
Figura 16: Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade coagulante de leite da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo.....	38
Figura 17: Avaliação da estabilidade da atividade coagulante de leite da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo em diferentes temperaturas.....	39
Figura 18 : Efeito da concentração de cloreto de cálcio sobre a atividade coagulante de leite da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo.....	40
Figura 19: Efeito da concentração de cloreto de sódio sobre a atividade coagulante de leite da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo.....	41

Figura 20: Gráfico baseado na curva de Michaelis-Menten.....	42
Figura 21: Gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk.....	43
Figura 22: Imagem do queijo produzido diretamente do extrato bruto de folhas de cinamomo.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade coagulante de leite e proteolítica da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo.....	43
--	----

LISTA DE SIGLAS

BANA.....	N α -benzoil-DL-arginina β -naftilamida
BSA.....	Albumina de soro bovino
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
DMSO.....	Dimetilsulfóxido
EDTA.....	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EB.....	Extrato Bruto
HCl.....	Ácido Clorídrico
K _m	Constante de Michaelis-Menten
M.....	Molaridade
μ g.....	Micrograma
mg.....	Miligrama
μ l.....	Microlitro
ml.....	Mililitro
mM.....	Milimolar
NaCl.....	Cloreto de Sódio
nm.....	Nanômetro
pH.....	Potencial Hidrogeniônico
PVP.....	Polivinilpirrolidona
SARS-CoV-2.....	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
TRIS.....	Tris(hidroximetil)aminometano
V _{max}	Velocidade Máxima da reação

xg.....Força Centrífuga Relativa

β mercaptoetanolBeta mercaptoetanol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. A planta cinamomo (<i>Melia azedarach</i>)	16
1.2. Proteases e suas aplicações	18
1.3. As proteases na indústria alimentícia	19
1.3.1. A aplicação de proteases na produção de queijo	20
2. OBJETIVO	23
2.1. Objetivo Geral	23
2.2. Objetivos Específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Obtenção de material vegetal	24
3.2. Extração de proteínas vegetais	24
3.3. Dosagem de Proteínas	25
3.4. Detecção de Atividade Proteolítica no Extrato Bruto de folhas de cinamomo	25
3.5. Ensaio de Atividade proteolítica para determinação do pH ideal da enzima do EB de folhas de cinamomo	26
3.6. Ensaio de Atividade proteolítica para determinação da temperatura ideal da enzima do EB de folhas de cinamomo	26
3.7. Ensaio de Atividade proteolítica para determinação da estabilidade da enzima do EB de folhas de cinamomo em diferentes pHs	26
3.8. Ensaio de Atividade proteolítica para determinação da estabilidade da enzima do EB de folhas de cinamomo em diferentes temperaturas	27
3.9. Avaliação da cinética enzimática da protease do EB de folhas de cinamomo	27
3.10. Detecção de Atividade Coagulante da protease do EB de folhas de cinamomo	27
3.11. Avaliação do efeito da Temperatura sobre a atividade coagulante de leite da protease do EB de folhas de cinamomo	28
3.12. Avaliação do efeito do pH sobre a atividade coagulante de leite da protease do EB de folhas de cinamomo	28
3.13. Efeito da concentração ideal de Sais	29
3.14. Ensaio de atividade coagulante para determinação da estabilidade da enzima do EB de folhas de cinamomo em diferentes temperaturas	29
3.15. Ensaio de atividade coagulante para determinação da estabilidade da enzima do EB de folhas de cinamomo em diferentes pHs	29
4. RESULTADOS	30
4.1. Detecção de atividade proteolítica no extrato bruto de folhas de cinamomo	30
4.2. Detecção de atividade coagulante no extrato bruto de folhas de cinamomo	31
4.3. Efeito do pH sobre a atividade proteolítica da protease contida no extrato bruto de folhas de cinamomo	32
4.4. Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica da protease contida no extrato bruto de folhas de cinamomo	34
4.5. Efeito do pH sobre a atividade coagulante de leite da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo	36
4.6. Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade coagulante de leite da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo	38
4.7. Avaliação do efeito de sais sobre a atividade coagulante de leite da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo	40
4.8. Avaliação da Cinética Enzimática da protease do EB de folhas de cinamomo	42
4.9. Razão= (ACL/AP)	43
4.10. Elaboração de queijo a partir do uso da protease do EB de folhas de cinamomo	44

5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÃO	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 A PLANTA CINAMOMO (*Melia azedarach*)

Melia azedarach L. é uma espécie exótica, originária da China e Índia, pertencente à família Meliaceae e conhecida popularmente no Brasil como cinamomo, santa-bárbara, jasmim-de-caiena, lilás-de-soldado, dentre outras denominações (LORENZI et al., 2003). A planta foi introduzida no Brasil entre o final do século XIX e início do século XX, para atender aos padrões paisagísticos da época (OLIVEIRA et al., 2013). Atualmente, a espécie está adaptada e amplamente distribuída nas diferentes regiões do país, principalmente nas regiões subtropicais, onde apresenta maior ocorrência (BRUNHEROTTO et al., 2010).

É uma árvore caducifólia, com altura de 15 a 20 metros, possui folhas decíduas e alternas, sendo muito utilizada como sombra, na arborização de ruas (Figura 1) e como planta ornamental (LORENZI et al., 2003). Possui a vantagem de produzir grande quantidade de folhas e frutos (BURKS, 1997), além de crescimento rápido, o que contribui para que várias partes da planta sejam utilizadas, como a casca da raiz, casca do tronco, folhas, flores, frutos e sementes (LOVATTO et al., 2012).



Figura 1: *Melia azedarach*. Autor: Valter Jacinto

Conforme Lovatto e colaboradores (2012), o cinamomo possui propriedades bioativas já comprovadas cientificamente e assim como em outras espécies da família das Meliáceas, verifica-se em sua composição a presença da azadiractina, um importante composto químico da classe dos limonoides que possui propriedades terapêuticas, além de ações inseticidas e tóxicas, apesar da baixa toxicidade ambiental. Na medicina popular, as diversas partes do

cinamomo, principalmente em países nativos da planta, são utilizadas há anos no tratamento de várias doenças (OELRICHS et al., 1983).

Segundo Araújo e colaboradores (2009), diversos estudos já foram realizados a fim de elucidar as principais propriedades dessa espécie, diferenciando os compostos e princípios ativos presentes em cada parte da planta e assim validar o potencial do seu uso na indústria farmacêutica e bioquímica. Nas folhas do cinamomo estão presentes quatro compostos ativos (azadiractina, salanina, meliantriol e nimbim), diversas classes de metabólitos (limonoides, triterpenoides e esteroides, alcaloides, proteínas, fenóis e fitoesteróis), além do alcaloide paraisina, o flavonoide rutina e a meliacina (LOVATTO et al., 2012; VIEIRA & FERNANDES, 1999). Dentre as propriedades terapêuticas conferidas a planta, a mesma possui potencial antiviral (ALCHÉ et al., 2003). Segundo Hosseini (2020), a meliacina, um peptídeo presente nas folhas do cinamomo, foi eficaz contra a multiplicação do vírus da febre aftosa e do herpes simples tipo 1 (HSV-1), além de inibir, *in vitro*, a multiplicação do vírus da febre hemorrágica, “junin”. Por ser considerada uma planta medicinal, artigos recentes citam a espécie dentre aquelas que possuem compostos bioativos naturais que podem ajudar a fortalecer o sistema imunológico contra infecções por SARS-CoV-2, causador da atual pandemia de covid-19 (DANG & GEZICI, 2020).

Na literatura, já foram descritas proteases cisteínicas presentes no cinamomo. Primeiramente, foi detectado uma protease em frutos amarelos maduros (Figura 2), a qual foi denominada Melain R (KANEDA et al., 1994), posteriormente, outra protease (Melain G) foi isolada a partir dos frutos verdes da planta (UCHIKOBA et al., 1999) (Figura 3). Proteases cisteínicas presentes em algumas plantas possuem forte potencial comercial, pois apresentam grande atividade proteolítica e são ativas em uma ampla faixa de temperatura e pH (FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2011).



Figura 2: Frutos amarelos maduros do cinamomo.
Fonte: ©PBTA



Figura 3: Frutos verdes do cinamomo. Fonte: ©DREAMSTIME

1.2 PROTEASES E SUAS APLICAÇÕES

Para Laguna & Egito (2001), há muito tempo, o homem já vem utilizando proteases tanto de origem animal quanto de origem vegetal. Em países do mediterrâneo, como Portugal, há registro da utilização de proteases extraídas de folhas secas de espécies da família Asteraceae em substituição de enzimas digestivas extraídas de bezerros lactantes (GUINÉ et al., 2019).

As proteases ou peptidases são enzimas catalisadoras da hidrólise de ligações peptídicas nas quais proteínas são degradadas em aminoácidos ou peptídeos menores (SILVA-LOPEZ, 2010), realizando assim a transferência de elementos do substrato para a água (WHITAKER, 1994). Conforme Sumantha e colaboradores (2006), as enzimas proteolíticas possuem propriedades específicas que as identificam e diferenciam uma das outras como: especificidade do substrato, mecanismo catalítico, pH e temperaturas ótimas, sítio ativo e perfil de estabilidade.

Como as proteases são fisiologicamente necessárias para os organismos vivos, elas podem ser encontradas em uma ampla diversidade de lugares nos seres vivos, como plantas, animais e micro-organismos (RAO et al., 1998). As proteases vegetais participam do processo de defesa da planta contra pragas e patógenos (TORNERO et al., 1997), podendo ser expressas como constitutivas ou induzidas (VAN DER HOORN & JONES, 2004). Além de contribuir em outras atividades como: regulação do apoptose, fotossíntese, expressão gênica (SOLOMOM et al., 1999; ESTELLE, 2001; ADAM, 2000) e liberação de aminoácidos nos órgãos de reserva (XAVIER-FILHO, 1992).

Em relação ao sítio de ação específico, as peptidases podem ser divididas em duas classes: endopeptidases e exopeptidases. As endopeptidases, também denominadas proteinases, realizam a clivagem de ligações peptídicas internas. As exopeptidases catalisam as ligações próximas às extremidades das cadeias polipeptídicas: Ligações N-terminais ou C-terminais, podendo ser denominadas amino- ou carboxi-peptidases, respectivamente. Aquelas que atuam em um N-terminal liberam um único resíduo de aminoácido, um dipeptídeo ou um tripeptídeo. As exopeptidases que atuam em um C-terminal liberam um único resíduo ou um dipeptídeo (BARRETT, 1994; GOMES, 2004; RAWLINGS et al., 2006)(Figura 4). De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as peptidases são classificadas em subgrupos de acordo com seus resíduos catalíticos. As carboxipeptidases são subdivididas em serina, metalo e cisteína-peptidases. As endopeptidases são subdivididas em

serina, cisteína, aspártica, metalo , treonina e glutâmico-peptidases. Cada subgrupo contendo o resíduo aminoácido característico e quanto as metalopeptidases, um metal é necessário para exercer a catálise (DOS SANTOS et al., 2016).

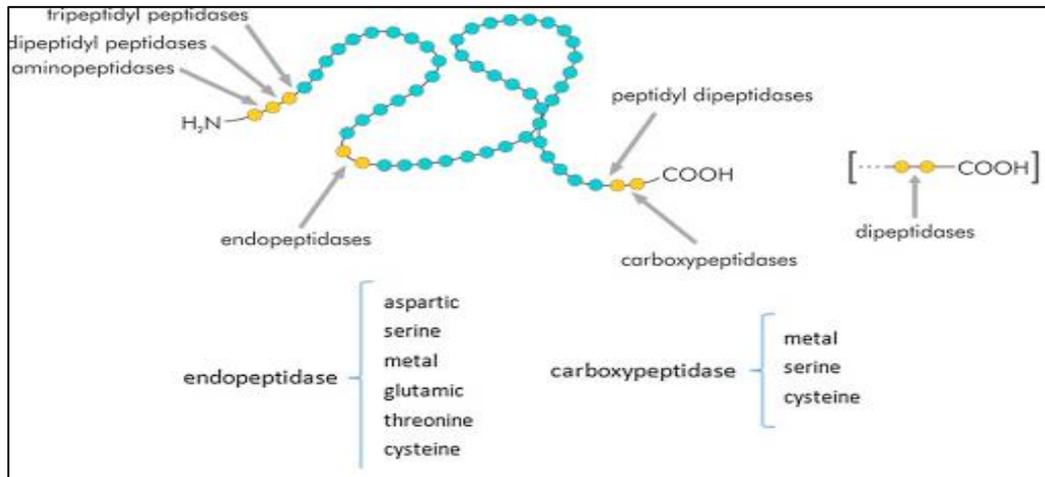


Figura 4: **Classificação de peptidases.** Os círculos amarelos e azuis representam os aminoácidos. Os amarelos indicam a sequência de aminoácidos que se ligará a peptidase. As setas apontam para o local de clivagem no substrato. Fonte: Science Direct, 2018.

As proteinases cisteínicas são uma das classes de proteases vegetais mais importantes e estudadas. Elas participam do desenvolvimento das plantas, desde a germinação de sementes, mobilização de proteínas reservas, senescência até a morte celular programada. (HAQ et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2003). Nessa classe de proteases de plantas inclui-se a papaína, que é uma enzima encontrada no mamão (*Carica papaya*) e a bromelaína, protease derivada do caule e fruto do abacaxi (*Ananas comosus*). Essas proteases vegetais já são conhecidas e amplamente empregadas na indústria de cosméticos, alimentícia e medicinal (ARSHAD et al., 2014; TYMOSZUK et al.; 2016).

1.3 AS PROTEASES NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA

As proteases ainda são essenciais para a área comercial, pois representam aproximadamente 60% do mercado total de enzimas, constituindo um dos maiores grupos de biocatalisadores industriais (ARAÚJO, 2020; SILVA, E., 2013). São utilizadas largamente na indústria de limpeza, como os detergentes; na indústria têxtil e em aplicações médicas (GUPTA et al., 2002). Na indústria alimentícia, os processos que envolvem a atividade metabólica das proteases são fundamentais na preparação de diversos produtos (DINI, et al. 2010). Por isso, elas vêm sendo empregadas na panificação, produção de queijos, costumam ser usadas no processo de fabricação de cerveja e são eficientes amaciadores de carne (SILVA, E., 2013). A

indústria alimentícia tem importante contribuição para o mercado de enzimas. Estima-se que em 2017, houve uma participação de 26%, o que correspondeu ao valor de US\$ 1,4 bilhão (ARAÚJO, 2020).

1.3.1 A APLICAÇÃO DE PROTEASES NA PRODUÇÃO DE QUEIJO

A fabricação de queijo é o campo de maior volume de aplicação das proteases na indústria alimentícia, sendo essa uma das principais razões pelas quais elas apresentam grande importância para este setor (DINI et al., 2010; SGARBIERI, 2005). A quimosina, também conhecida como renina, é uma protease coagulante do leite extraída do quarto estômago de bezerros desmamados e muito utilizada na fabricação da maioria dos queijos (HASHIM et al, 2011, KLOOSTERMAN, 1991). No coalho bovino há uma proporção na quantidade de quimosina e pepsina. Em bezerros recém nascidos, a proporção de quimosina é de 80% e da pepsina é de 20%, já nos animais mais velhos, essa proporção é inversa entre as duas enzimas (ANDRÉN, 1998). A quimosina possui um grau maior de especificidade em relação a pepsina, o que a torna uma das principais enzimas utilizadas na produção de queijo, por apresentar propriedades ideais ao funcionamento do processo como: possui baixa atividade proteolítica generalizada e alta especificidade para a caseína, uma importante proteína do leite, atuando no sítio de hidrólise entre os resíduos de aminoácidos fenilalanina (posição 105) e metionina (posição 106). (RAO et al., 1998; KUMAR et al., 2005; GAJO et al., 2012) (Figura 5).

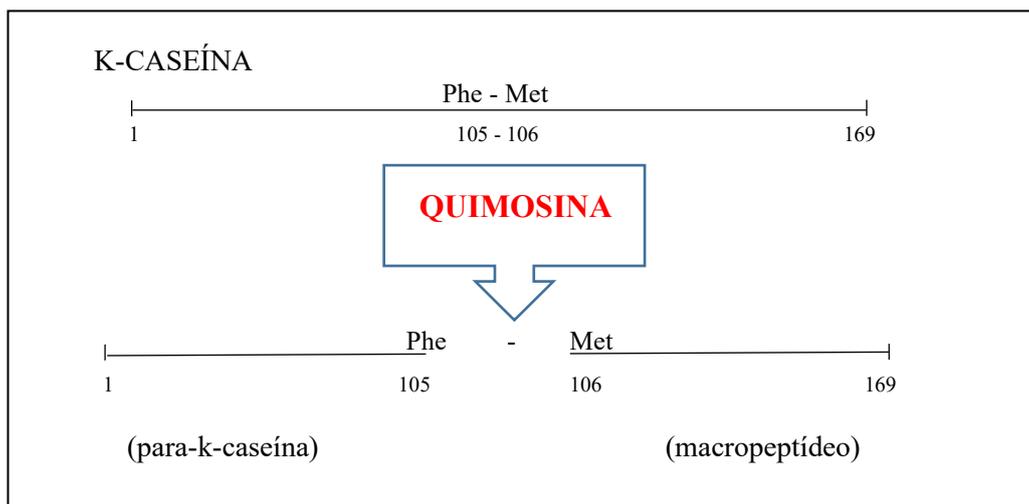


Figura 5: **Mecanismo de ação da quimosina.** A quimosina quebra a ligação peptídica da k-caseína (camada externa da caseína) entre Phe 105 e Met 106, havendo a formação da para-k-caseína e liberação de macropeptídeos. Fonte: Próprio autor, baseado em GILLILAND (1991).

O leite é uma emulsão de gorduras em água estabilizada por uma dispersão coloidal de proteínas. As proteínas do leite são classificadas de acordo com suas propriedades físico-químicas e estruturais: caseínas, proteínas do soro, proteínas das membranas dos glóbulos de gorduras e enzimas (SGARBIERI, 2005). No processo de produção de queijo, as proteases coagulantes participam desde a coagulação do leite até a maturação do queijo, atuando na hidrólise da k-caseína, havendo a desestabilização das micelas presentes na proteína do leite (NAGODAWITHANA & REED, 1993). O termo coalho refere-se à enzima obtida dos bezerros, no caso a renina e muitas vezes conhecida como coalho animal (SCOTT et al., 1998; SARDINAS, 1972), já as enzimas utilizadas na coagulação do leite, mas que não são obtidas do abomaso de ruminantes, são chamadas coagulantes (ANDRÉN, 2011).

Nas últimas décadas houve maior demanda na produção mundial de queijos e o aumento do custo da quimosina bovina, proveniente da escassez de reninas de bezerros (FOX et al., 2000). Para suprir essa demanda, além de atender setores que abominam o uso do coalho animal por questões éticas e religiosas (AHMED et al., 2010), busca-se constantemente novas alternativas de enzimas coagulantes como forma de substituir a quimosina (FOX et al., 2000; VISSER, 1993). Essas novas fontes de enzimas podem ser de origem microbiana, obtidas por fermentação e de origem vegetal (BENEDET, 1993; JACOB et al., 2011).

No Brasil, desde 2005, pesquisadores da Embrapa Caprinos em parceria com um laboratório francês (URAFPA), vem realizando pesquisas com o objetivo de obter proteases coagulantes vegetais na perspectiva de desenvolver novos produtos para o mercado. (EGITO & LAGUNA, 2006). Extratos vegetais de espécies nativas e exóticas do Nordeste tiveram suas atividades coagulantes testadas no leite de cabra e vaca, obtendo resultados parciais promissores para 5 amostras dentre 130 testadas. Os extratos vegetais de semente de girassol foram um dos que obtiveram melhores resultados na coagulação do leite (EGITO et al., 1996).

Soares e colaboradores (2015) avaliaram o potencial do látex da fruta-pão como fonte de protease coagulante do leite, identificando o melhor desempenho da temperatura e pH. Para avaliar o potencial de um extrato vegetal na coagulação do leite, vários fatores são necessários para caracterizar a estabilidade enzimática: pH, temperatura, força iônica, concentração de enzimas e sais (CRABBE, 2004). Essa avaliação é importante para a escolha das enzimas que irão agir na fabricação do queijo, devido a diferenças de atividades proteolíticas de cada protease vegetal (SILVA et al., 2009).

As enzimas que são usadas como coalhos, como a quimosina, são caracterizadas pela alta e específica atividade coagulante e baixa atividade proteolítica (HARBOE et al., 2010). Os coagulantes substitutos dos coalhos animais na coagulação do leite devem seguir as propriedades específicas desejáveis: possuir alta atividade coagulante, promover proteólise limitada da caseína e ter baixa atividade proteolítica em pH e temperatura, pois os coagulantes com alta atividade proteolítica diminuem o rendimento. A atividade coagulante representa a especificidade da atividade proteolítica, como a clivagem da ligação de aminoácidos fenilalanina (posição 105) e metionina (posição 106) da caseína. A atividade proteolítica é generalizada, pois hidrolisa qualquer ligação peptídica da caseína, portanto é considerada inespecífica. (HISLOP, 2003; LUCEY & KELLY, 1994). Por isso, no estudo da caracterização e busca por opções de coalhos, um importante índice utilizado é a razão entre as atividades coagulantes e proteolíticas. Essa razão tem sido usada para determinar o potencial de proteases como agentes coagulantes do leite para a manufatura de queijos (ARIMA et al., 1970). Segundo Gomes & Polizelli (2020), no estudo para conhecer as melhores ações de enzimas, a cinética enzimática torna-se importante, pois ela elucidada a variação da velocidade da reação enzimática em condições diferentes experimentais, como a concentração do substrato, concentração do extrato bruto, pH e temperatura.

As enzimas têm sido o principal alvo de pesquisas em biotecnologia devido a potencialidade em diferentes atividades. No Brasil há uma ampla diversidade de vegetais, o que possibilita ser um grande promissor em fonte sustentável de enzimas (GARCIA et al., 2017). As investigações com o intuito de avaliar novas alternativas de proteases coagulantes para a indústria, podem resultar em melhores produtos e alimentos inovadores com sabores e texturas diferentes (COELHO et al., 2017; MERHEB et al., 2007). A variedade de opções de coagulantes vegetais torna-se importante para os consumidores que optam por não consumir queijos derivados de coalho animal, além de melhorar os benefícios ambientais e contribuir para o desenvolvimento sustentável (COELHO et al., 2017; FOLGADO & ABRANCHES, 2019). Desse modo, este trabalho visa avaliar através de análises preliminares a atividade de coagulação do leite de protease extraída do extrato bruto proteico de folhas do cinamomo a fim de contribuir com novas aplicações.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Detectar e caracterizar bioquimicamente a atividade proteolítica e coagulante de proteases bioativas presentes no extrato bruto proteico de folhas de *M.Azedarach*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar atividade proteolítica de protease extraída do extrato bruto de folhas de *M.Azedarach*. ;
- Detectar atividade coagulante de protease extraída do extrato bruto de folhas de *M.Azedarach*. ;
- Caracterizar bioquimicamente o efeito da temperatura e pH sobre a atividade proteolítica de protease extraída do extrato bruto de folhas de *M.Azedarach*.;
- Caracterizar bioquimicamente o efeito da temperatura e pH sobre a atividade coagulante de protease extraída do extrato bruto de folhas de *M.Azedarach*.;
- Caracterizar bioquimicamente o efeito da concentração de sais para a atividade coagulante do leite de protease extraída do extrato bruto das folhas de *M.Azedarach*.;
- Determinar as constantes cinéticas aparentes K_m e V_{max} da equação de Michaelis Menten das proteases extraídas do extrato bruto de folhas de *M.Azedarach*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção de material vegetal

Folhas de *M.azedarach* foram coletadas nos municípios de Campos dos Goytacazes e São João da Barra, no Estado do Rio de Janeiro e transportadas até o laboratório do NUPSA e mantidas em temperatura ambiente (Figura 6). A espécie foi identificada e registrada no Herbário da UNIRIO sob o número de voucher HUNI 1374. O material foi lavado para a retirada de impurezas e posteriormente seco em estufa a 40 °C até a desidratação total. As folhas secas foram então pulverizadas em aparelho moedor para obtenção de um pó, que foi posteriormente utilizado para a extração de proteínas.



Figura 6: **Folhas de cinamomo.** Fonte: Próprio autor

3.2 Extração de proteínas vegetais

A extração de proteínas foi realizada a partir do pó de folhas de cinamomo (3 g), acrescido de Polivinilpirrolidona (PVP) 10% (referente ao peso seco de folhas). Foram então adicionados 12ml de solução NaCl 250 mM, mantendo a proporção de 1:4 (para cada grama de folha pesada, foram adicionados 4 ml de solução NaCl). A mistura resultante foi submetida a agitação vigorosa por 30 minutos, a 4°C. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 15000 xg a 4°C durante 30 minutos. O sedimentado resultante foi descartado e o sobrenadante recolhido, sendo denominado extrato bruto proteico (EB).

3.3 Dosagem de Proteínas

A dosagem de proteínas das amostras do extrato bruto foi realizada implementando o método descrito por Bradford (1976) e tendo como referência a curva padrão da proteína BSA. Para a construção da curva padrão foi utilizada uma solução de 100 µg/ µl de BSA distribuída em tubos de microcentrífuga nas concentrações individuais 0 µg, 2 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg e 10 µg adicionadas à água MilliQ para alcançar o volume de 200 µl. Em cada tubo foram então acrescentados 800 µl do corante Bradford, totalizando o volume final de 1 ml. Para a dosagem de proteínas das amostras foram utilizados diferentes volumes de EB, utilizando-se para o cálculo da dosagem a comparação com a curva padrão. A análise das amostras no espectrofotômetro foram realizadas a 595 nm.

3.4 Detecção de Atividade Proteolítica no Extrato Bruto de folhas de cinamomo

Para detectar atividade proteolítica no extrato bruto de folhas de *M. Azedarach*, o ensaio enzimático foi realizado com base na metodologia descrita por Siqueira-Junior e colaboradores (2002) utilizando BANA (5mM em DMSO 10%) como substrato e quimopapaína (2mg/ml) como enzima controle experimental. O ensaio consiste na incubação de diferentes frações do extrato bruto de folhas de cinamomo com tampão de ensaio Fosfato de Sódio 0,25M (pH 6,0) contendo EDTA 2,5mM; β-mercaptoetanol 25mM. Essa mistura foi mantida em incubação por 10 minutos a 37°C. Como controle positivo experimental, o extrato bruto vegetal foi substituído por uma solução de quimopapaína (2 µg) diluída em tampão Fosfato de Sódio 0,25 M (pH 6,0), sob as mesmas condições de ensaio. Para iniciar a atividade proteolítica, foram adicionados aos tubos 35 µl de BANA completando o volume de 350 µl totais. Como controle negativo, o substrato BANA foi incubado apenas com tampão de ensaio nas mesmas condições. Após 30 minutos de incubação a 37°C, foram adicionados 500 µl de HCl 2% em etanol para interromper a reação, seguidos de 500 µl da solução p-dimetilaminacinaldeído 0,06% em etanol. A mistura foi mantida por 30 minutos à temperatura ambiente para a reação colorimétrica gerada pelo reagente e os produtos de clivagem do substrato BANA. As amostras foram então analisadas em espectrofotômetro a uma absorbância de 540 nm. Os dados obtidos foram expressos em Unidade Enzimática (U.E), onde cada U.E é definida como o aumento de 0,01 nm na absorbância da amostra. Os dados também serviram para avaliar a Unidade Enzimática específica (U.E específica) que corresponde a U.E/ mg de proteína. Para calcular a atividade proteolítica específica (APE), usou-se o método de Walter (1984), com modificações, utilizando

a seguinte equação: $APE = [(UE \times V) / (E \times t)] / \text{mg}$, onde UE é Unidade Enzimática; V é o volume total do tubo reacional; E é o volume do extrato bruto e t é o tempo de reação.

3.5 Ensaio de Atividade proteolítica para determinação do pH ideal da enzima do EB de folhas de cinamomo

Para determinação do pH ideal da enzima do EB, os ensaios de atividades proteolíticas foram realizados da mesma forma descrita no item 3.4 alterando apenas o tampão de ensaio de acordo com as diferentes faixas de pH a serem observadas. Os tampões utilizados foram: Citrato Fosfato (250mM) para os pHs 3,4,5 e 6; Fosfato de Sódio (250mM) para os pHs 6, 7 e 8; Tris-HCl (250mM) para os pHs 8,9,10 e 11. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.6 Ensaio de Atividade proteolítica para determinação da temperatura ideal da enzima do EB de folhas de cinamomo

Os ensaios para determinar a temperatura ótima para a atividade proteolítica foram realizados em diferentes temperaturas, variando de 30 a 100°C, com intervalos de 10° C. Os experimentos foram realizados em triplicata, conforme descrito no item 3.4. Nos ensaios foi utilizado o tampão de ensaio no qual obteve-se maior atividade proteolítica em resposta ao pH, conforme metodologia descrita no item 3.5.

3.7 Ensaio de Atividade proteolítica para determinação da estabilidade da enzima do EB de folhas de cinamomo em diferentes pHs

Para determinação da estabilidade da protease do EB em diferentes pHs, a amostra foi incubada previamente por 60 minutos à 37 °C em tampões com diferentes faixas de pH. Os tampões utilizados foram: Citrato Fosfato (250mM) para os pHs 3, 4,5 e 6; Fosfato de Sódio (250mM) para os pHs 6,7 e 8; Tris-HCl (250mM) para os pHs 8,9 e 10. Os ensaios foram realizados em triplicata na temperatura e pH ideais. Os dados foram expressos como atividade residual (%) e comparados com o controle (amostra mantidas nas condições ideais de temperatura e pH), considerada como atividade 100%.

3.8 Ensaio de Atividade proteolítica para determinação da estabilidade da enzima do EB de folhas de cinamomo em diferentes temperaturas

Para determinação da estabilidade à temperatura, a amostra foi incubada previamente nas temperaturas 30,40,50,60,70,80,90 e 100 °C durante 60 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata e na temperatura e pH ideais. Os dados foram expressos como atividade residual (%) e comparados com o controle (amostra não incubada), considerada como atividade 100%.

3.9 Avaliação da cinética enzimática da protease do EB de folhas de cinamomo

V_{max} é a velocidade inicial máxima e representa o valor no qual a concentração do substrato está elevada e a enzima torna-se saturada. O K_m é a constante de Michaelis-Menten e representa o valor da concentração do substrato na qual a velocidade inicial da reação é a metade da velocidade máxima. Para a determinação dos parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m), o ensaio de atividade proteolítica foi realizado utilizando o substrato BANA em diferentes concentrações (1mM; 2mM; 3 mM; 4 mM; 5 mM; 6 mM; 7 mM; 8 mM; 9 mM e 10mM). Os ensaios foram realizados em triplicata nas mesmas condições experimentais descritas no item 3.4. Os parâmetros cinéticos foram calculados seguindo o modelo de curva de Michaelis-Menten e no método de gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk, ambos plotados no Microsoft Excel (FOGLER, 1992; LEHNINGER,1976).

3.10 Detecção de Atividade Coagulante da protease do EB de folhas de cinamomo

O ensaio de coagulação do leite foi realizado com base no método de Arima et al (1970). Foi preparada uma solução de leite desnatado na concentração de 10% em tampão $CaCl_2$ (10mM) em pH 6,5. Em seguida, alíquotas da solução foram incubadas por 10 minutos à 50 °C. Após esse tempo, o ensaio foi iniciado adicionando nos tubos referenciados como controle 10 μ l de coagulante (quimosina comercial) e nos tubos de amostra, 100 μ l de extrato bruto proteico, totalizando em cada tubo um volume final de 1 ml. O andamento da atividade foi observado por um período mínimo de 2 horas, para verificação da formação dos primeiros grumos de coagulação do leite. A atividade de coagulação do leite (ACL) foi calculada usando a equação expressa em unidades Soxhlet (Sw). Uma unidade soxhlet é definida como a

quantidade de preparação de enzima que coagula 1 ml de leite desnatado em 40 minutos a 35°C. A seguinte equação (1) foi usada para calcular a atividade de coagulação do leite:

$$ACL = S_w = \frac{M \times 35 \times 2400}{E \times t \times T} \quad \text{onde:}$$

M - Volume do substrato (ml)

E - Quantidade de enzima (mg) (1)

t - Tempo de coagulação (segundos)

T - Temperatura de reação (°C)

Para detectar a capacidade coagulante do extrato bruto, foi calculado a unidade de atividade específica de coagulação do leite (UAECL), que foi definida como a quantidade de enzima (em miligramas) necessária presente em 1 ml de extrato capaz de coagular 10 ml de leite em 40 minutos e foi calculada de acordo com Shata (2005), com modificações: $UAECL = [2400/t \times S/E]/mg$, onde t é o tempo necessário para formação dos primeiros grumos (em segundos), S é o volume de solução com leite, E é o volume de extrato bruto e mg a quantidade de proteína no extrato bruto.

3.11 Avaliação do efeito da Temperatura sobre a atividade coagulante de leite da protease do EB de folhas de cinamomo

Para a avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade da protease do EB, os ensaios de coagulação do leite foram realizados em diferentes temperaturas (25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90°C) seguindo os procedimentos do item 3.10. Os experimentos foram realizados em triplicata e ao final foi calculado a unidade Soxhlet (equação 1) para cada temperatura. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP).

3.12 Avaliação do efeito do pH sobre a atividade coagulante de leite da protease do EB de folhas de cinamomo

Para a avaliação do efeito do pH sobre a atividade da protease do EB, os ensaios de coagulação do leite foram realizados na temperatura ótima detectada no item 3.11 e em diferentes faixas de pH. Para cada pH, foi preparado uma solução de leite desnatado na

concentração de 10% em tampão de ensaio. Os tampões utilizados foram: Citrato Fosfato (50mM) para os pHs 3,4,5 e 6; Fosfato de Sódio (50mM) para os pHs 6 e 7 e Tris-HCl (50mM) para os pHs 8,9 e 10. Os experimentos foram realizados em triplicata e ao final foi calculado a unidade Soxhlet (equação 1) para cada faixa de pH. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP).

3.13 Efeito da concentração ideal de Sais

Os ensaios para detectar os efeitos da quantidade de sais na coagulação do leite foram realizados utilizando CaCl_2 e NaCl em diferentes concentrações (0,10,50,100,500 e 1000mM) cada. Os ensaios foram realizados na temperatura ótima e tendo como tampão aquele do pH ideal encontrado anteriormente, conforme metodologia descrita no item 3.10. Foi calculado a unidade Soxhlet (equação 1) para cada concentração de sal verificada.

3.14 Ensaio de atividade coagulante para determinação da estabilidade da enzima do EB de folhas de cinamomo em diferentes temperaturas

Para determinação da estabilidade à temperatura, uma quantidade de amostra (0,22 mg) foi incubada previamente nas temperaturas 30,40,50,60,70,80,90 e 100 °C durante 60 minutos. Os ensaios foram realizados na temperatura, pH e concentração de sal ideais. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP).

3.15 Ensaio de atividade coagulante para determinação da estabilidade da enzima do EB de folhas de cinamomo em diferentes pHs

Para determinação da estabilidade ao pH, uma quantidade de amostra (0,22 mg) foi incubada previamente por 60 minutos à 37 °C em tampões com diferentes faixas de pH. Os tampões utilizados foram: Citrato Fosfato (50mM) para os pHs 4,5 e 6; Fosfato de Sódio (50mM) para os pHs 6 e 7 e Tris-HCl (50mM) para os pHs 8,9 e 10. Os ensaios foram realizados na temperatura, pH e concentração de sal ideais. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP).

4. RESULTADOS

4.1 Detecção de atividade proteolítica no extrato bruto de folhas de cinamomo

Para verificar a atividade proteolítica do extrato bruto das folhas de cinamomo, após o processo de extração e dosagem de proteínas, realizou-se o ensaio enzimático utilizando como substrato BANA (5mM). A Figura 7 mostra que houve atividade proteolítica sobre o substrato na presença do extrato bruto e nos tubos (Tampão) sem EB, não houve atividade.

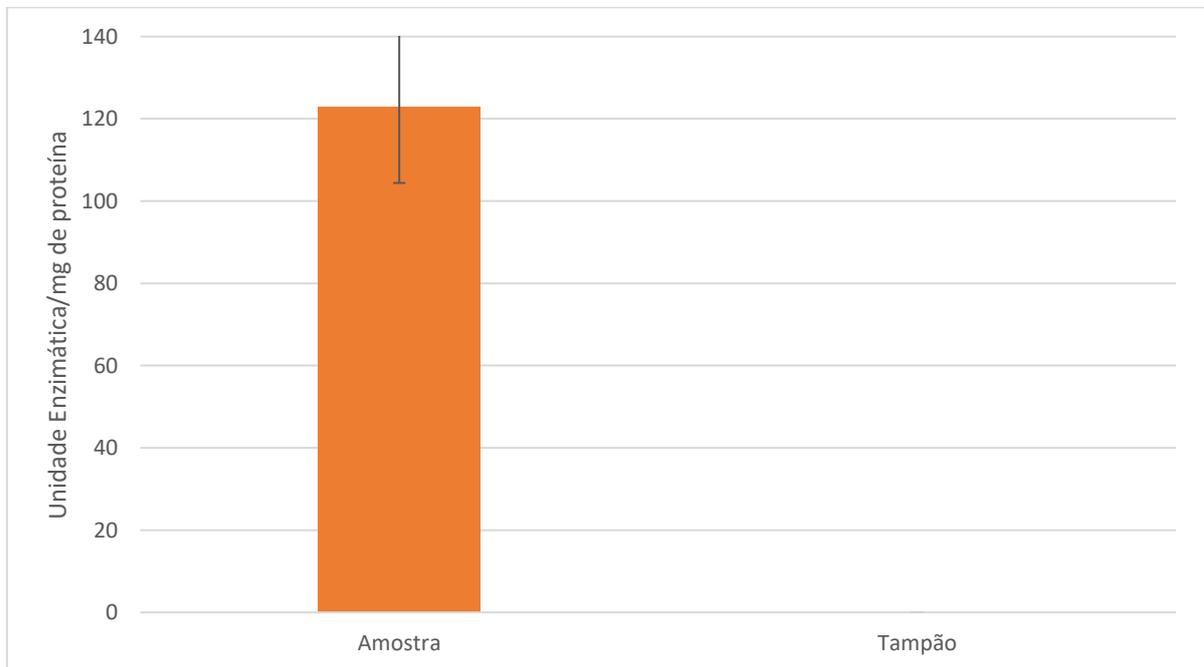


Figura 7: **Avaliação da atividade proteolítica no extrato bruto de folhas de *M.Azedarach*.** Amostra: Tubo contendo Tampão fosfato (Ph 6,0), Substrato e EB; Tampão: Tubo contendo Tampão fosfato (pH 6,0) e Substrato. Cada barra equivale a média de três experimentos independentes. As linhas partindo das barras representam o desvio padrão ($P < 0,05$).

4.2 Detecção de atividade coagulante no extrato bruto de folhas de cinamomo

Após a detecção da atividade proteolítica, o extrato bruto das folhas de cinamomo foi submetido ao teste de coagulação e a atividade de coagulação do leite (ACL) foi calculada conforme descrito no item 3.10 (equação 1). O EB apresentou atividade coagulante de aproximadamente 1 ACL. Essa atividade não é percebida quando apenas a solução tampão é utilizada no ensaio, demonstrando a presença de uma protease coagulante no extrato bruto (Figura 8). Os resultados da coagulação do leite pela protease foram satisfatórios conforme ilustrado na Figura 9. No controle negativo (A) não houve coagulação, na amostra contendo quimosina (B), usada como controle positivo e na amostra contendo EB (C) houve coagulação do leite.

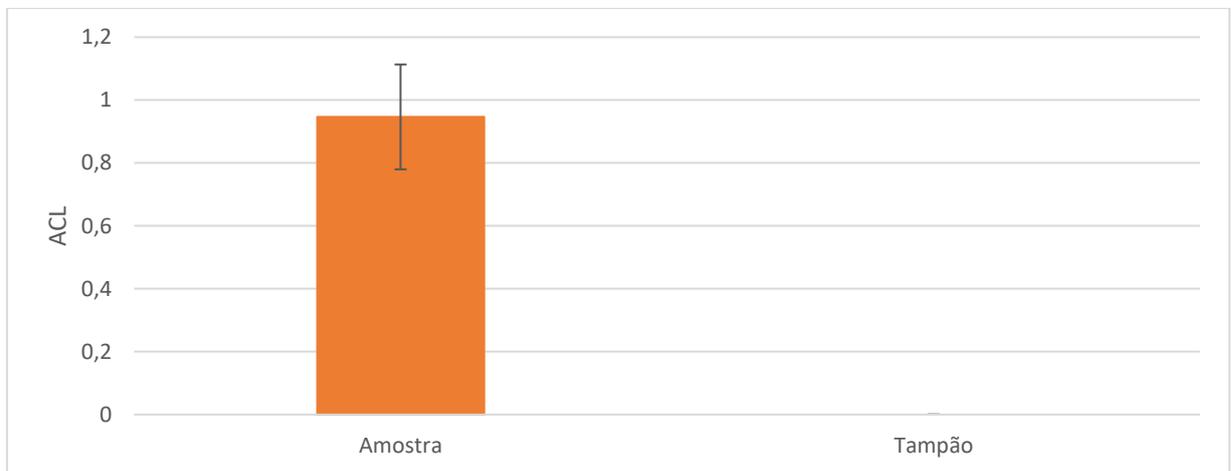


Figura 8: **Análise da atividade coagulante de leite das proteínas contidas no extrato bruto de folhas de cinamomo.** Atividade de coagulação do leite (ACL) da Amostra. Sem a presença do EB, não houve coagulação do leite. Cada barra representa a média de três experimentos independentes junto com a indicação de \pm desvio padrão. Os ensaios foram feitos a 50 °C.



Figura 9: **Foto demonstrativa do processo de coagulação do leite pela protease do extrato bruto de folhas de cinamomo.** (A) – Solução tampão (Leite 10% em CaCl₂ 10mM); (B) - Solução tampão incubada com 10 μ l de Quimosina (controle); (C) - Solução tampão incubada com 0,45 mg de extrato bruto das folhas de cinamomo.

4.3 Efeito do pH sobre a atividade proteolítica da protease contida no extrato bruto de folhas de cinamomo

A Figura 10 mostra a variação da atividade proteolítica da protease contida no extrato bruto quando submetido a diferentes valores de pH. Os resultados demonstram que a protease do EB apresentou atividade proteolítica em todos os pHs testados. Houve atividade maior entre os pHs 6,0 e 8,0, sendo o pH 7,0 considerado o ideal para a atividade mais significativa da enzima. Assim, esse pH foi utilizado nos demais experimentos de atividade proteolítica.

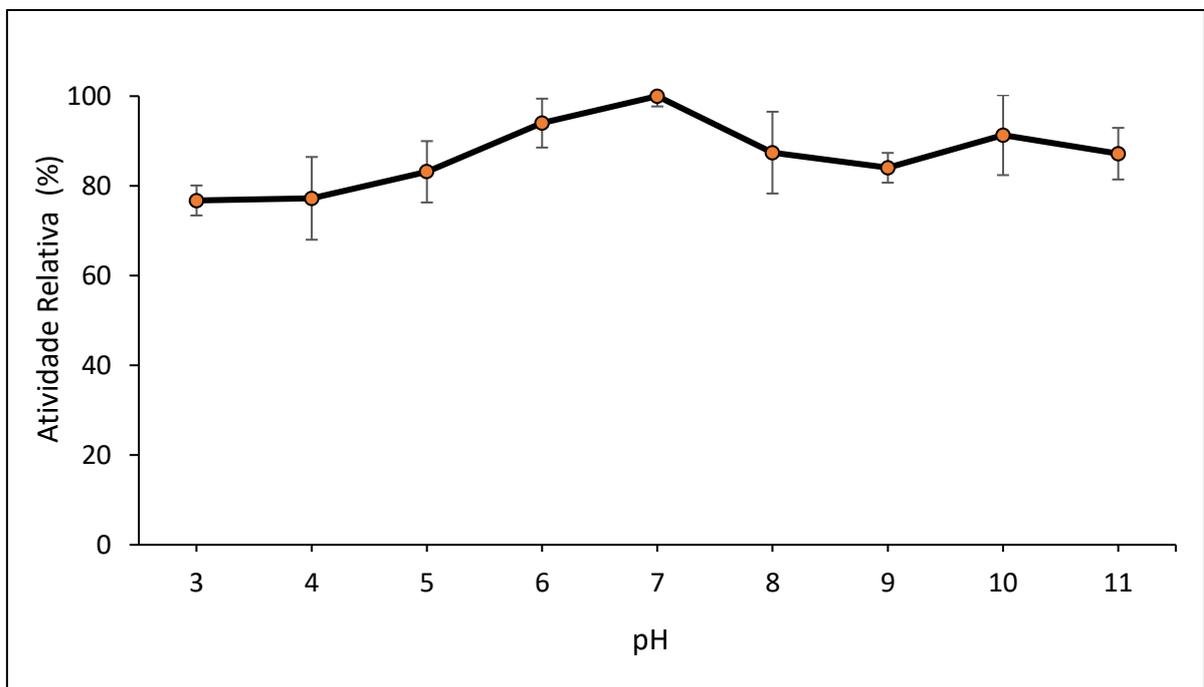


Figura 10: **Avaliação do efeito do pH sobre a atividade proteolítica da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo.** Os tampões utilizados para avaliar o efeito do pH sobre a atividade enzimática foram: Citrato-Fosfato 250mM (pH 3; 4 e 5); Fosfato de Sódio 250mM (pH 6 e 7); Tris-HCl 250mM (Ph 8;9;10 e 11). Cada ponto equivale a média de três experimentos independentes. As linhas partindo dos pontos representam o desvio padrão ($P < 0,05$).

O efeito do pH sobre a estabilidade da atividade proteolítica da protease do EB foi avaliada em diferentes pHs, conforme mostrado na figura 11. Após tratamento nos diferentes pHs durante 60 minutos, foi possível perceber que em todos os pH testados a atividade proteolítica foi superior a 60%, mas a maior estabilidade ocorreu na faixa de pH nos quais a enzima mantém sua atividade ótima.

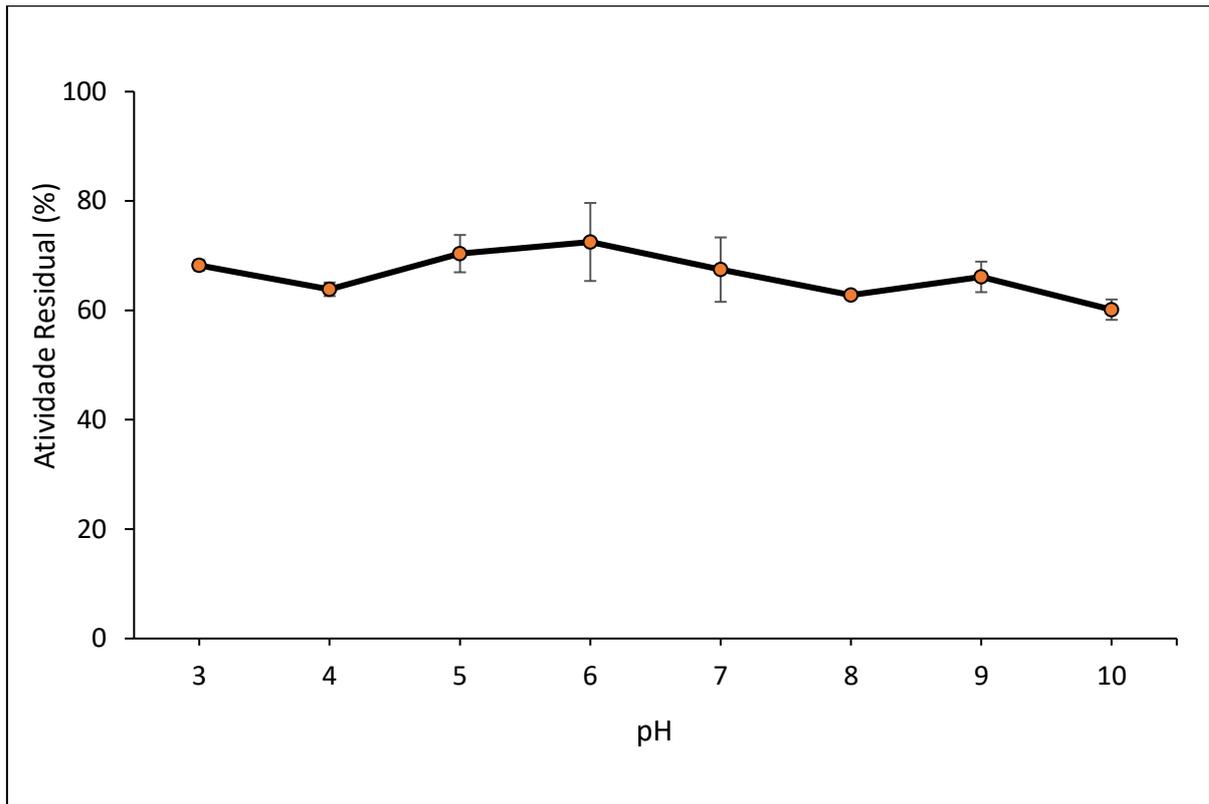


Figura 11: **Avaliação da estabilidade da atividade proteolítica da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo em diferentes pHs.** A atividade residual (%) foi verificada usando BANA (5mM) como substrato. O ensaio enzimático foi realizado em pH 7,0 a 37 °C. Cada ponto equivale a média de três experimentos independentes. As linhas partindo dos pontos representam o desvio padrão ($P < 0,05$).

4.4 Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica da protease contida no extrato bruto de folhas de cinamomo

Os ensaios realizados para determinar o efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica da protease do EB de folhas de cinamomo foram realizados de 30 a 100 °C, usando BANA (5mM) como substrato. Conforme pode ser observado na Figura 12, a atividade proteolítica no extrato é mais proeminente entre 30 e 70 °C, atingindo maior atividade a 40°C. Em temperaturas superiores a 70°C a atividade da protease do EB é comprometida, sendo totalmente inativada à 80°C.

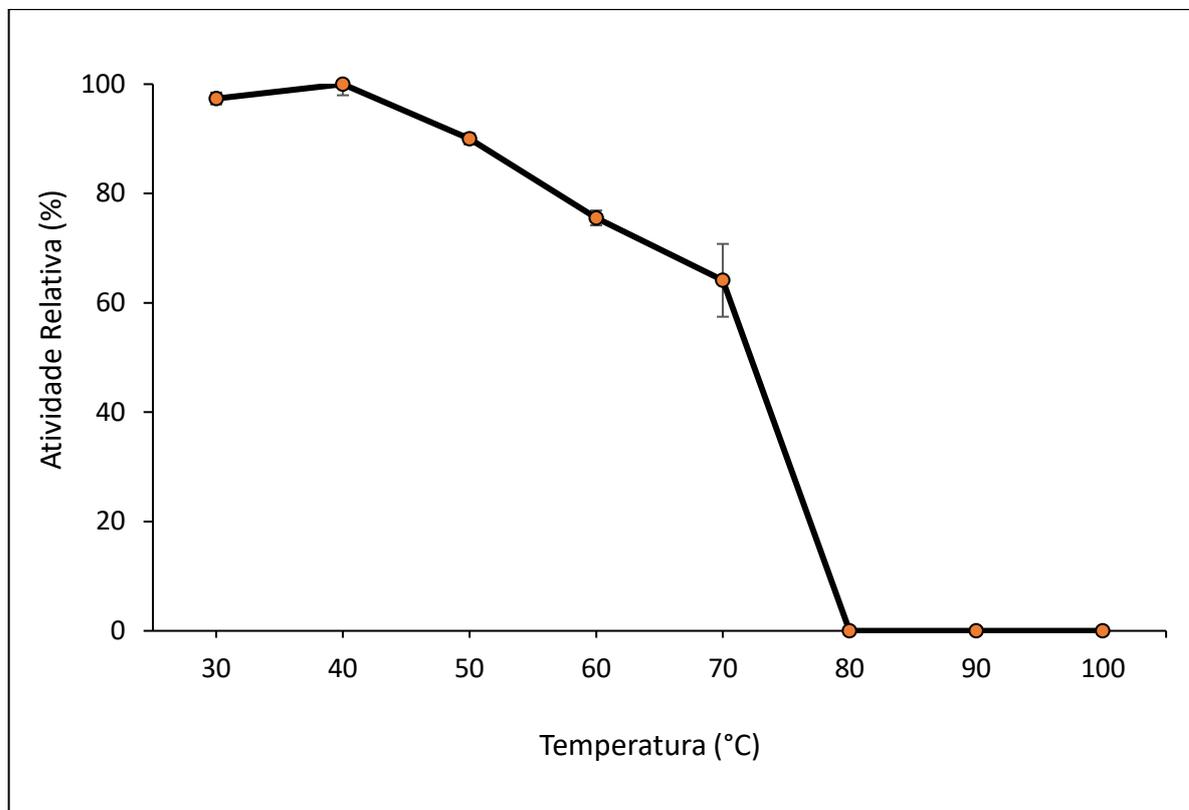


Figura 12: **Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo.** O efeito da temperatura na atividade proteolítica do EB foi determinado em tampão Fosfato de Sódio 250mM (pH 7), entre 30 e 100 °C. A atividade relativa (100%) equivale ao valor atingido pela temperatura em que a protease possui maior atividade proteolítica. Cada ponto equivale a média de três experimentos independentes. As linhas partindo dos pontos representam o desvio padrão ($P < 0,05$).

Em relação ao efeito da temperatura sobre a estabilidade da atividade proteolítica, o extrato enzimático manteve atividade entre 30 e 100 °C, após incubação de 60 minutos. Atividade Residual manteve-se entre 64 e 86%, sendo a maior estabilidade observada a 40°C (Figura 13).

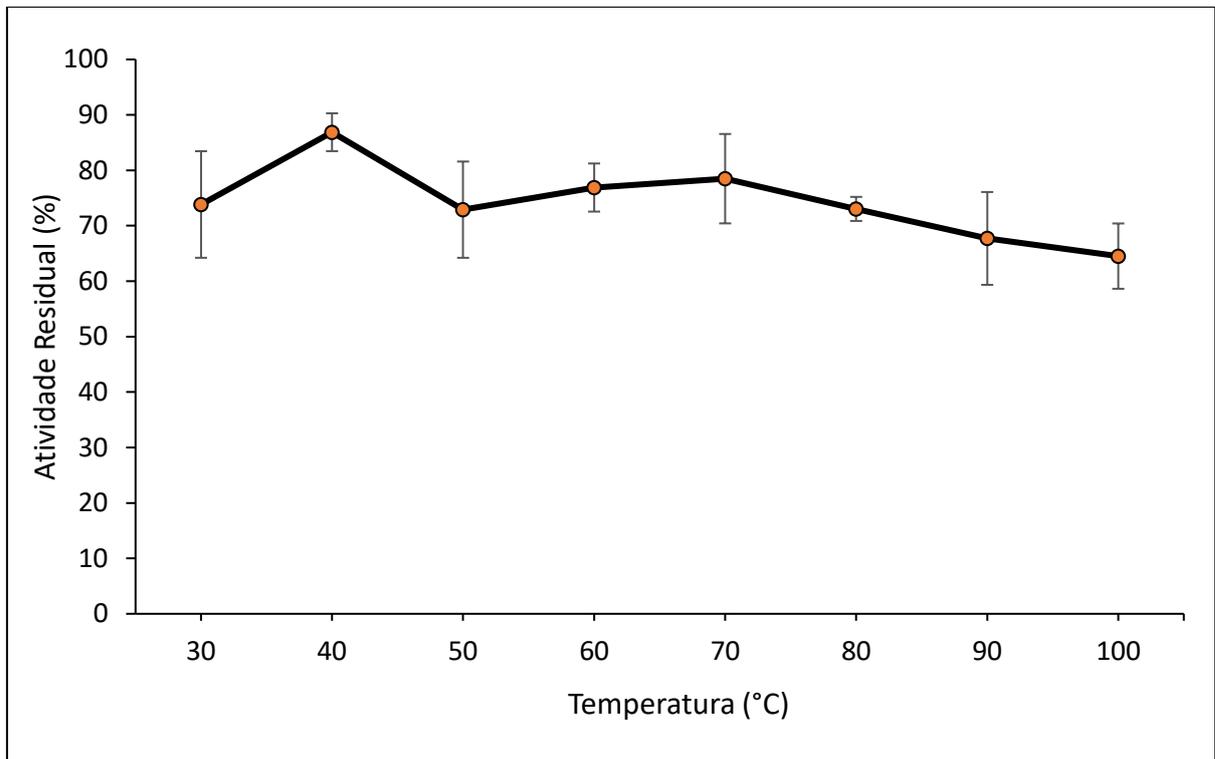


Figura 13: **Avaliação da estabilidade da atividade proteolítica da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo em diferentes temperaturas.** O EB foi incubado em diferentes temperaturas (30 a 100°C) por 60 minutos. A estabilidade térmica foi determinada em tampão Fosfato de Sódio 250mM (pH 7) a 40°C. A atividade residual considera o valor da temperatura em que a protease atinge maior atividade (Figura 9) como 100%. Cada ponto equivale a média de três experimentos independentes. As linhas partindo dos pontos representam o desvio padrão ($P < 0,05$).

4.5 Efeito do pH sobre a atividade coagulante de leite da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo

O perfil da atividade de coagulação do leite em diferentes pHs da protease do EB de folhas de cinamomo é mostrado na Figura 14. A enzima apresentou atividade coagulante entre os pHs 4,0 e 7,0 e tendo como pH ótimo para atividade coagulante o pH 5,0. Em pH 4,0, houve cerca de 89% da atividade máxima e em pH 7,0 essa atividade atingiu aproximadamente 79%. Em pHs superiores a 7,0 a atividade da protease do EB é comprometida, sendo totalmente inativada em pH 8,0.

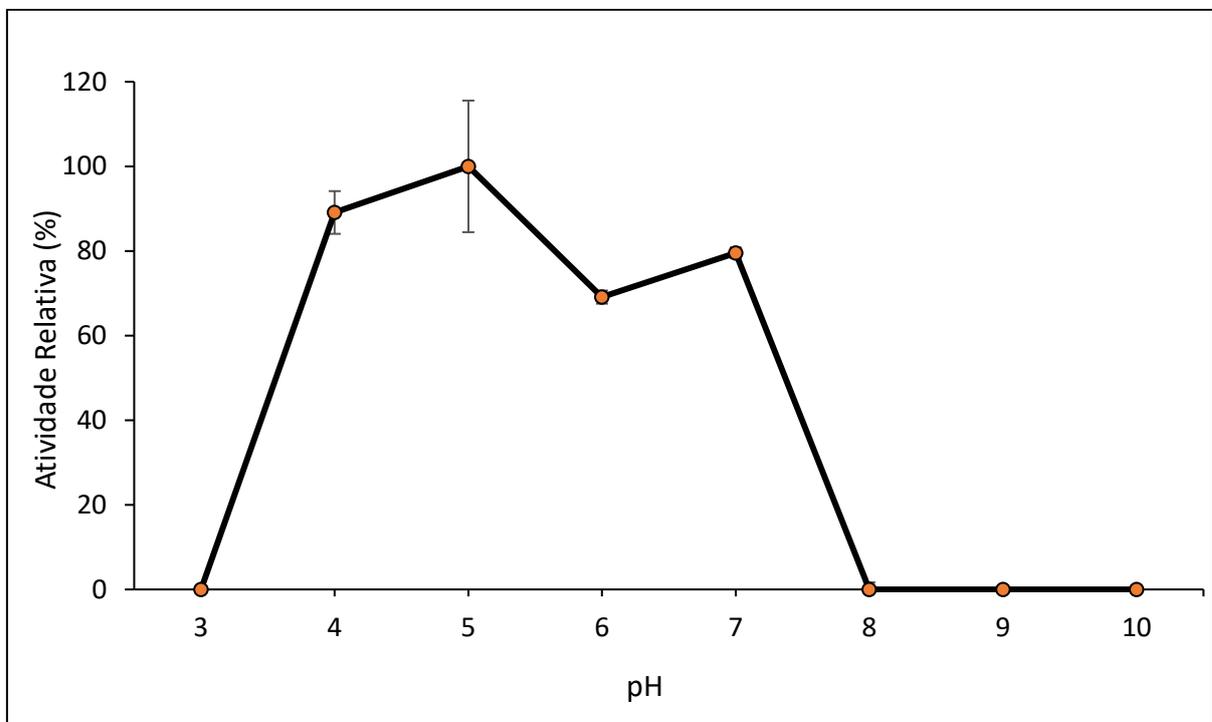


Figura 14: Avaliação do efeito do pH sobre a atividade coagulante de leite da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo. Os tampões utilizados para avaliar o efeito do pH sobre a atividade coagulante foram: Citrato-Fosfato 50mM (pH 3; 4 e 5); Fosfato de Sódio 50mM (pH 6 e 7); Tris-HCl 50mM (Ph 8;9;10). Cada ponto equivale a média de três experimentos independentes. As linhas partindo dos pontos representam o desvio padrão ($P < 0,05$).

A protease contida no extrato proteico de folhas de cinamomo apresentou estabilidade nos pHs avaliados (4,0 a 10,0). Obteve atividade acima de 100% em todas as faixas de pHs, após incubação de 60 minutos a 37° C (figura 15). Houve maior atividade em pH 4,0, onde a protease atingiu o valor de 134%, seguida de estabilidade similar no intervalo de pH 5,0 a 9,0 e uma discreta queda de atividade em pH 10,0. Em pHs mais alcalinos apesar de se manter estável, a atividade da enzima tem um leve declínio quando comparada a atividade da enzima após tratamento em pHs mais ácidos.

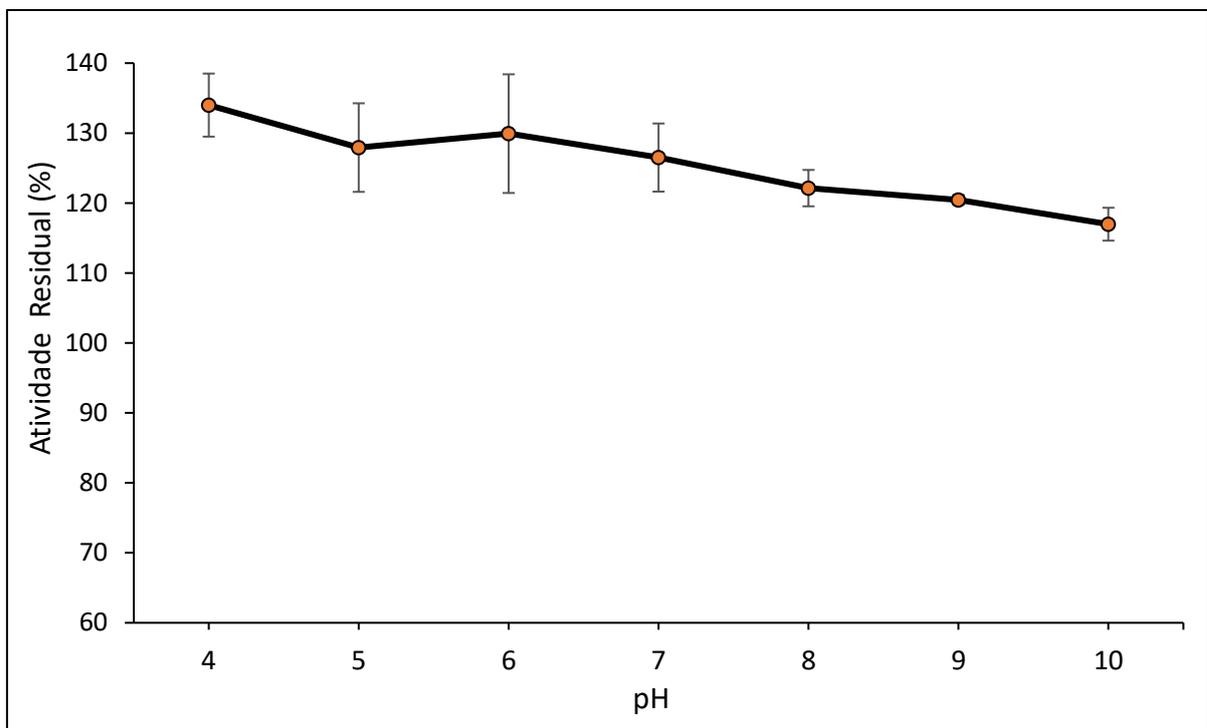


Figura 15: **Avaliação da estabilidade da atividade coagulante de leite da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo em diferentes pHs.** A atividade residual foi verificada com a incubação da enzima por 60 minutos em tampões: Citrato-Fosfato 50mM (pH 4,5 e 6); Fosfato de Sódio 50mM (pH 6 e 7); Tris-HCl 50mM (pH 8,9 e 10). Cada ponto equivale a média de três experimentos independentes. As linhas partindo dos pontos representam o desvio padrão ($P < 0,05$).

4.6 Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade coagulante de leite da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo

A caracterização do perfil de temperatura sobre a atividade coagulante de leite da protease do EB de folhas de cinamomo foi avaliada em diferentes temperaturas, variando de 25 a 90 °C, com intervalos de 5° C . Os resultados (Figura 16) mostram que a protease apresentou atividade coagulante a partir de 35° C , quando obteve aproximadamente 0,66 ACL. A atividade coagulante da protease foi significativa em temperaturas entre 35°C e 60°C, contudo a atividade mais proeminente ocorreu a 50°C sendo essa a temperatura ideal para a atividade coagulante do extrato. Temperaturas superiores a 65°C levaram a perda de atividade da protease do EB, que foi totalmente nula a partir de 70°C. Por ser considerada aquela em que a protease do EB manteve sua atividade máxima, a temperatura de 50° C foi utilizada nos demais experimentos de atividade de coagulação do leite.

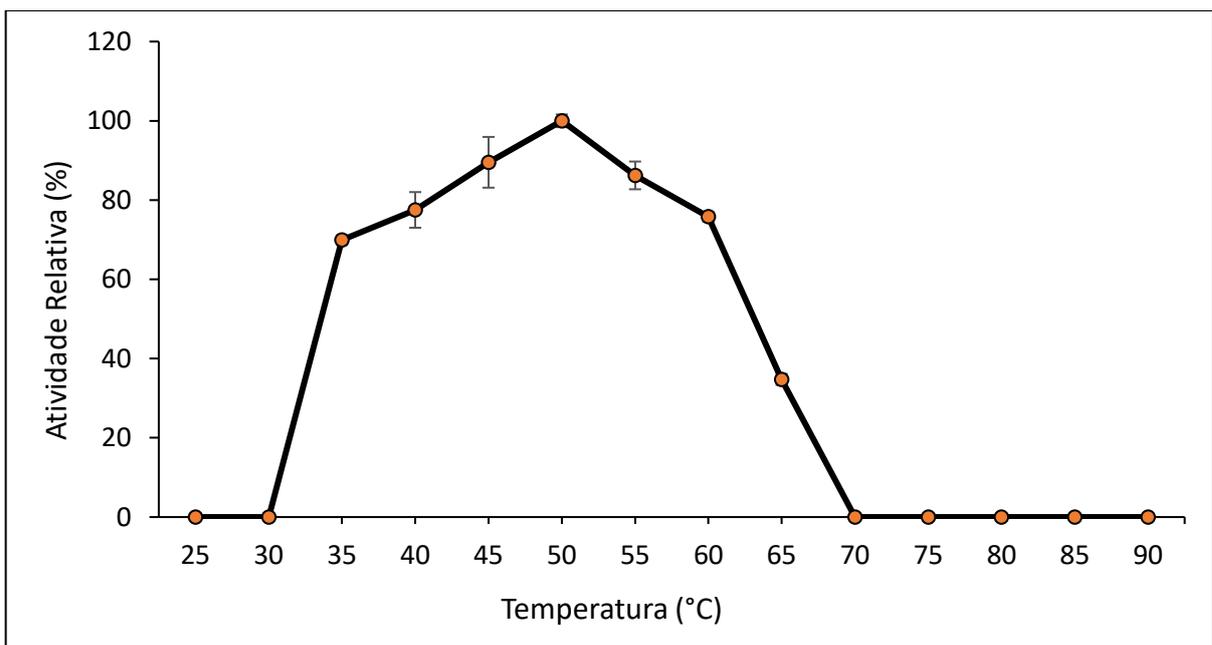


Figura 16: **Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade coagulante de leite da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo.** O efeito da temperatura na atividade coagulante do leite do EB de cinamomo foi determinado utilizando Solução tampão (Leite 10% em CaCl₂ 10mM), entre 25 e 90 °C. A atividade relativa (100%) equivale ao valor atingido pela temperatura em que a protease do EB possui maior atividade coagulante. Cada ponto equivale a média de três experimentos independentes. As linhas partindo dos pontos representam o desvio padrão ($P < 0,05$).

A avaliação do efeito da temperatura sobre a estabilidade da atividade coagulante da protease do EB de folhas de cinamomo foi verificada medindo a atividade residual após incubação da amostra por 60 minutos em temperaturas diferentes, de 30 a 100 ° C, com intervalos de 10 ° C. Os ensaios de coagulação do leite após incubação das amostras foram realizados na temperatura em que a protease atingiu atividade máxima (50°C). A protease do EB apresentou estabilidade térmica entre 30 e 60° C (figura 17). O tratamento em temperaturas maiores que 60°C causaram a desestabilização da atividade coagulante que foi eliminada totalmente a 70°C.

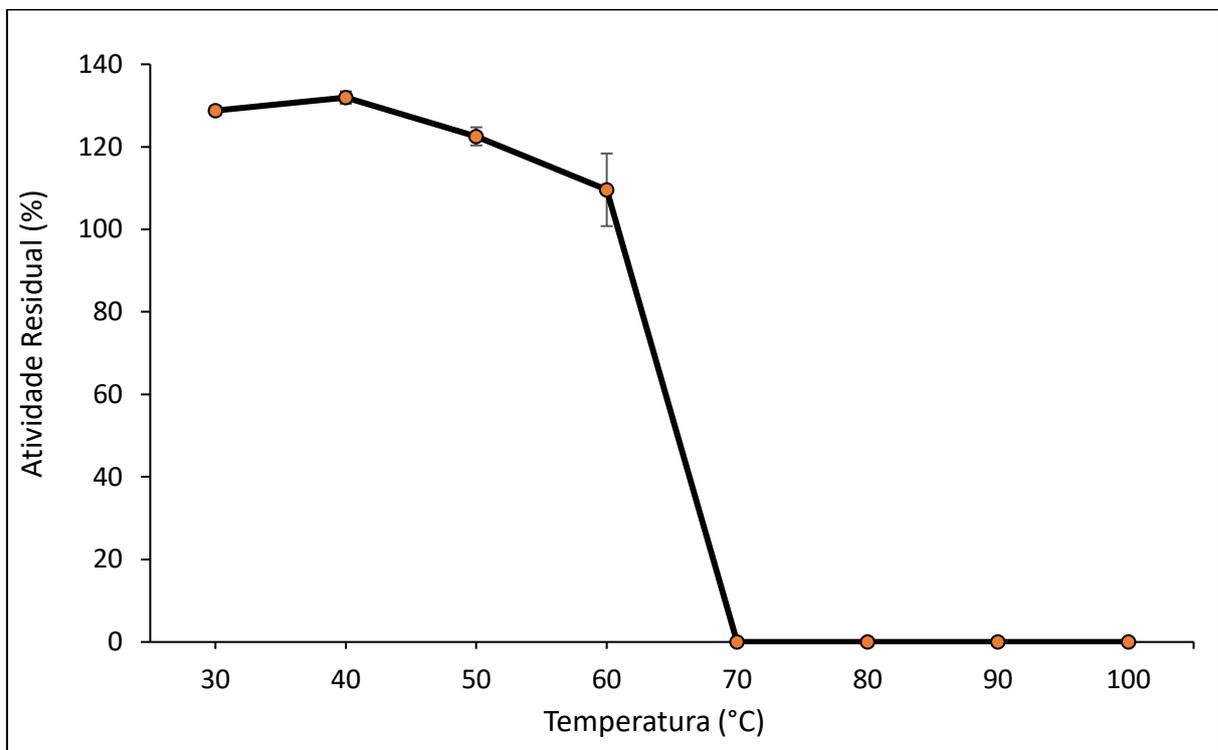


Figura 17: **Avaliação da estabilidade da atividade coagulante de leite da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo em diferentes temperaturas.** O EB de folhas de cinamomo foi incubado em diferentes temperaturas (30 a 100°C) por 60 minutos. O ensaio para verificar a estabilidade térmica foi determinada utilizando Solução tampão (Leite 10% em CaCl₂ 10mM) a 50 °C. A atividade residual considera o valor da temperatura em que a protease atinge maior atividade coagulante (Figura 13) como 100%. Cada ponto equivale a média de três experimentos independentes. As linhas partindo dos pontos representam o desvio padrão ($P < 0,05$).

4.7 Avaliação do efeito de sais sobre a atividade coagulante de leite da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo

Os efeitos do cálcio na atividade de coagulação do leite da protease do EB de folhas de cinamomo foram investigados. A figura 18 mostra que a variação de concentração de CaCl_2 interferiu na atividade de coagulação do leite da protease. Sem a presença desse sal, a atividade residual diminuiu 10%. A atividade máxima atingida foi na concentração de 50mM, com rendimento de 145,3%. Em concentrações maiores, a atividade decresceu até atingir o menor rendimento, de 83,1% na concentração de 1M.

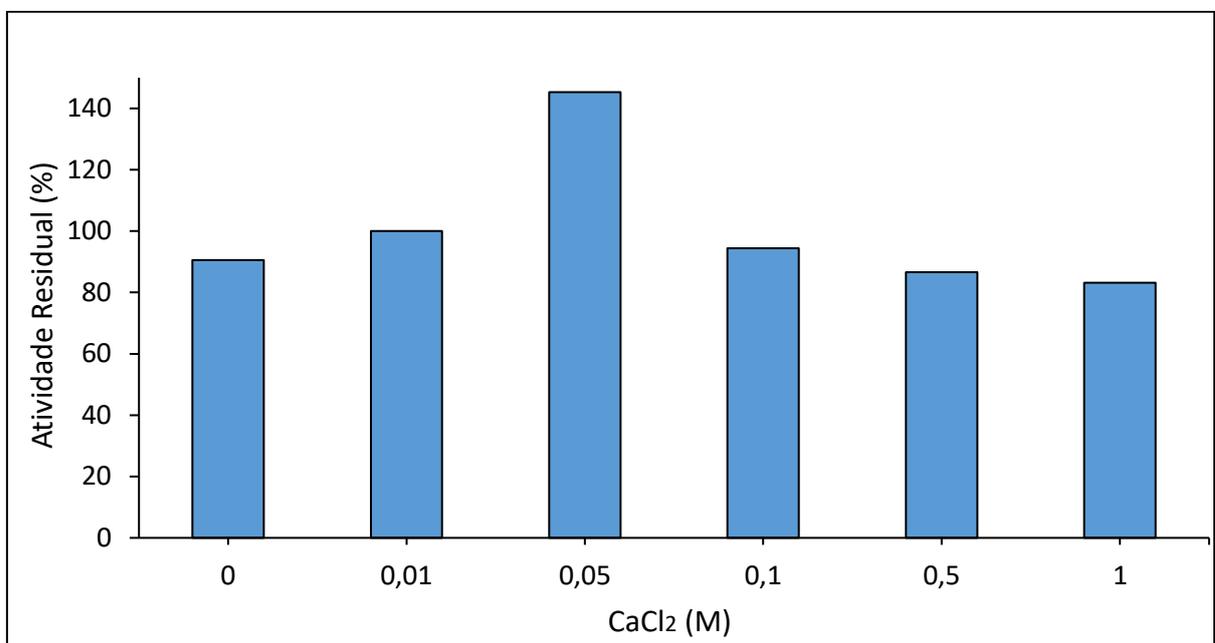


Figura 18: **Efeito da concentração de cloreto de cálcio sobre a atividade coagulante de leite da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo.** Efeito de CaCl_2 em diferentes concentrações (0; 0,01M; 0,05M; 0,1M; 0,5M e 1M) na atividade residual da protease do EB do cinamomo. A atividade residual foi determinada usando Solução tampão (Leite 10% em CaCl_2) / citrato fosfato pH 5,0 a 50°C.

A atividade da protease do EB na presença de sódio foi avaliada. Como resultado pode-se observar que na presença de 10 mM a atividade da enzima é reduzida em 77,2%, quando comparada ao controle (na ausência de sódio no tampão de ensaio). Concentrações maiores que 10mM eliminaram totalmente a atividade da enzima (figura 19).

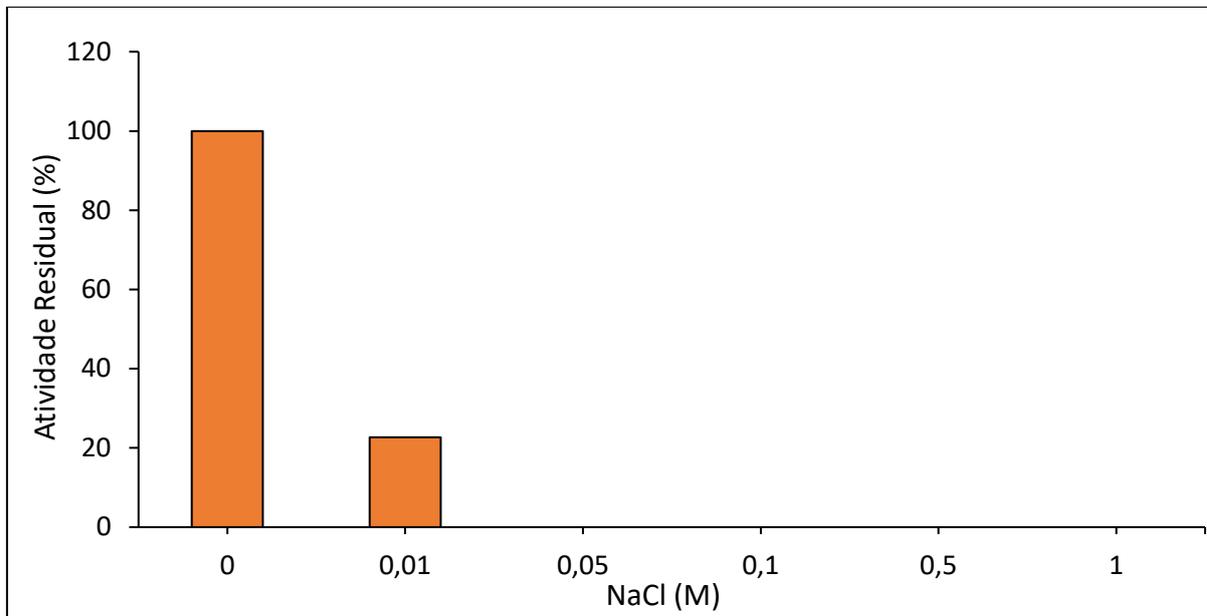


Figura 19: **Efeito da concentração de cloreto de sódio sobre a atividade coagulante de leite da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo.** Efeito de NaCl em diferentes concentrações (0; 0,01M; 0,05M; 0,1M; 0,5M e 1M) na atividade residual da protease do EB do cinamomo. A atividade residual foi determinada usando Solução tampão (Leite 10% em CaCl₂) / citrato fosfato pH 5,0 a 50°C.

4.8 Avaliação da Cinética Enzimática da protease do EB de folhas de cinamomo

Foi avaliado o efeito de diferentes concentrações do substrato BANA na atividade enzimática da protease do extrato bruto proteico de folhas de cinamomo. Como a enzima de folhas de cinamomo não foi purificada, obteve-se os valores aparentes para os parâmetros cinéticos V_{max} e K_m . Seguindo a curva de Michaelis-Menten (Figura 20) os valores foram: V_{max} = 156,84 U.E Específica (para 0,44 mg de proteína) e K_m = 0,738 mM. A figura 21 mostra a linearização da curva de Michaelis-Menten através do gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk, indicando o valor de $\frac{-1}{K_m}$, que representa a intersecção no eixo do substrato e a afinidade com a enzima.

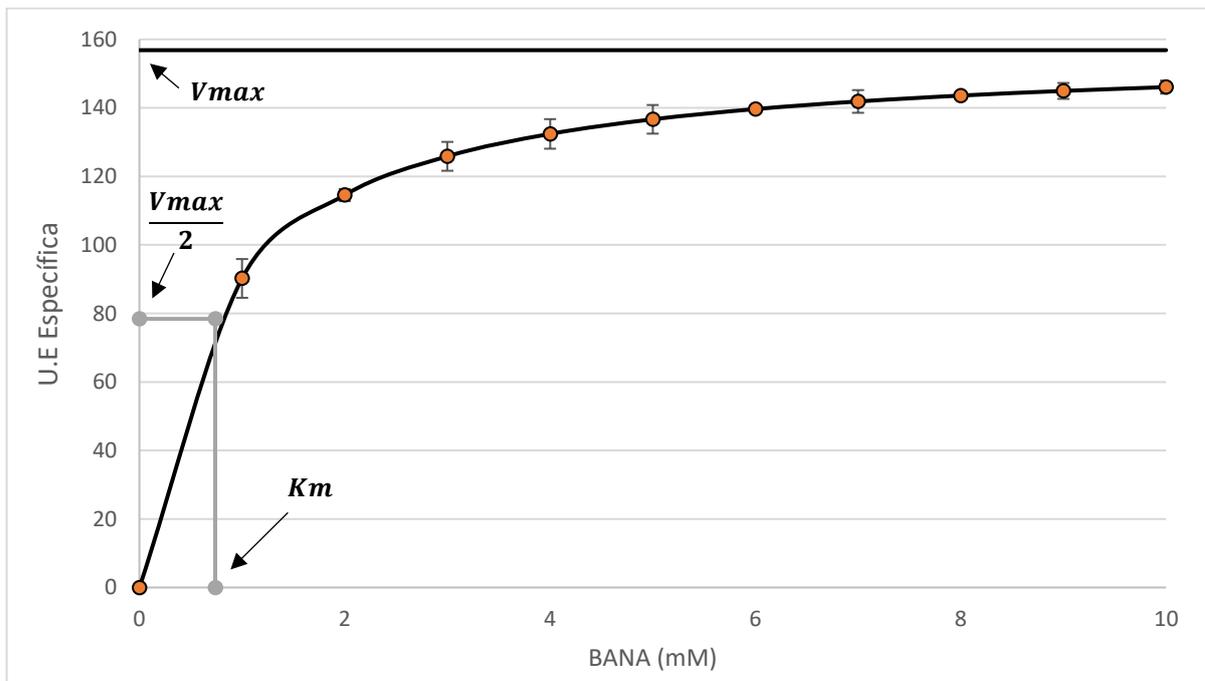


Figura 20: **Gráfico baseado na curva de Michaelis-Menten.** As concentrações do substrato variaram de 1 a 10mM. O gráfico indica a curva para a concentração de 0,44 mg de proteína e os valores de K_m (0,738mM); V_{max} (156,84 U.E Específica) e $\frac{V_{max}}{2}$ (78,42 U.E Específica). A Unidade Enzimática específica (U.E específica) corresponde a Unidade Enzimática/ mg de proteína. Cada ponto equivale a média de três experimentos independentes. As linhas partindo dos pontos representam o desvio padrão ($P < 0,05$).

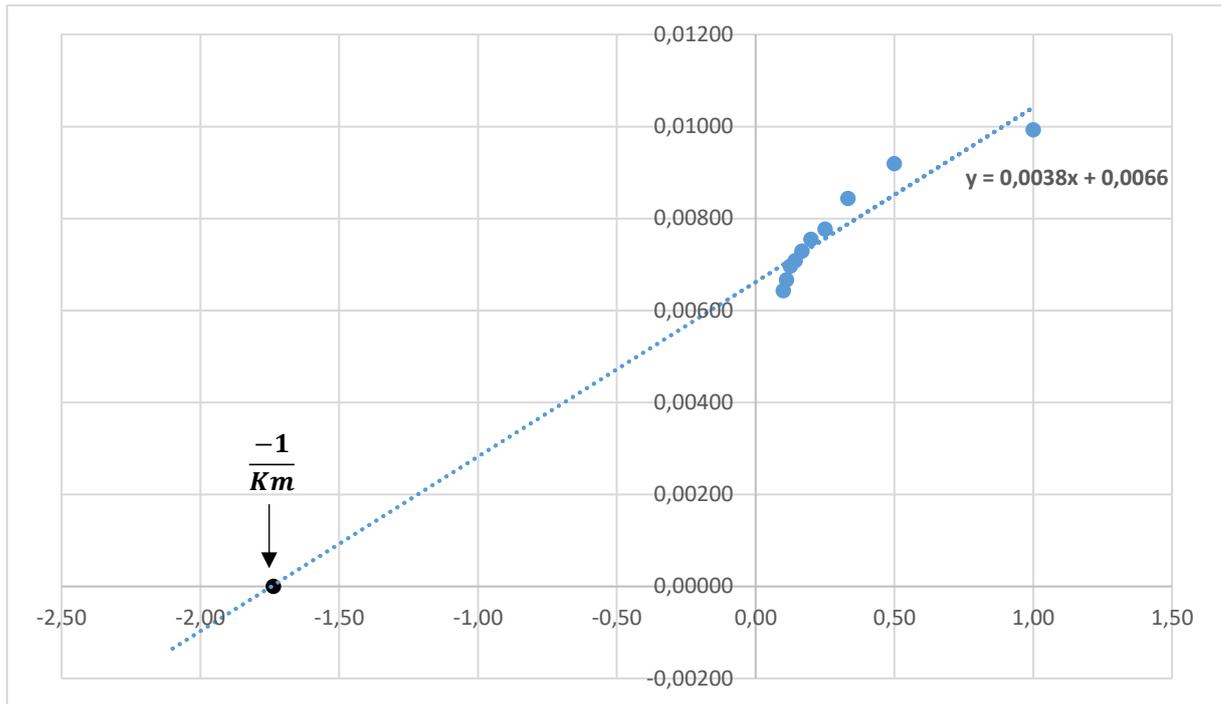


Figura 21: **Gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk.** A linha foi calculada por regressão linear e representa a afinidade da protease (0,44mg de enzima) com diferentes concentrações de substrato. O gráfico indica a equação da reta e o valor de $\frac{-1}{K_m}$.

4.9 R= (ACL/AP)

A razão entre atividade coagulante de leite (ACL) e atividade proteolítica (AP) é um dos critérios mais importantes para uma enzima coagulante ser considerada uma alternativa de coalho na fabricação de queijo. Um valor de R alto torna melhor a possibilidade de maior rendimento e qualidade do queijo produzido. A protease de folhas de cinamomo obteve um valor de R=58,89 e foi comparado com o valor da quimosina (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade coagulante de leite e proteolítica da protease do extrato bruto de folhas de cinamomo

Coagulante	ACL(U/mg)	AP(APE/mg)	R= ACL/AP (mg)
EB de folhas de cinamomo	13,427	0,228	58,89
Quimosina	164,75	0,791	209

Fonte: Moreno-Hernandez (2021). APE(Atividade proteolítica específica); U (Unidade Soxhlet).

4.10 Elaboração de queijo a partir do uso da protease do EB de folhas de cinamomo

O queijo obtido da protease do EB de folhas de cinamomo está mostrado na Figura 22. A solução de leite utilizada foi mantida em aquecimento durante 10 minutos. Após esse período foi adicionado aproximadamente 50ml de extrato bruto das folhas de cinamomo. O tempo de coagulação para a quantidade de substrato e coagulante utilizados foi de aproximadamente 30 minutos. Como resultado, o queijo apresentou aspecto semelhante ao queijo coalho, mas com textura mais firme, odor ligeiramente ácido e cor branco-esverdeado com grânulos, devido a presença da clorofila do extrato.



Figura 22: **Imagem do queijo produzido diretamente do extrato bruto de folhas de cinamomo.** Para o preparo do queijo, foi utilizado 1 litro de leite desnatado. As condições de preparo foram em pH 5,0; 50° C e adicionado ao leite CaCl₂ a 50mM, padrões ideais encontrados para a protease de folhas de cinamomo na coagulação do leite. Fonte: Próprio autor.

5. DISCUSSÕES

O presente trabalho detectou e caracterizou as atividades proteolíticas e coagulantes do extrato bruto de folhas de *Melia azedarach*. Os resultados dessas atividades foram satisfatórios e demonstraram o potencial dessa espécie como alternativa de coagulante vegetal. Segundo Shah e colaboradores (2014), proteases vegetais já foram descritas e identificadas de diferentes partes das plantas, como sementes, flores ou látex e usadas como coagulantes de leite. Enzimas de mesmas espécies vegetais vem sendo qualificadas e utilizadas tanto na indústria de medicamentos, na agricultura, quanto na indústria alimentícia (LEITE, 2016; REOLON-COSTA et al., 2017). A atividade proteolítica e coagulante foi observada com a presença de extrato proteico de folhas de cinamomo, já no controle negativo, contendo tampão, mas sem as proteínas contidas no tecido foliar, não se observou as atividades. Isso demonstra que o processo de extração proteica possibilitou a extração de uma protease com atividade proeminente sobre o substrato BANA, assim como sobre a caseína do leite.

O extrato bruto proteico apresentou atividade proteolítica em todas as faixas de pHs e foi maior quando o ensaio foi realizado em pH 7,0. Nos ensaios de estabilidade, a atividade proteolítica manteve atividade residual acima de 60% em todas as faixas de pHs analisadas. O resultado do pH difere do encontrado em uma protease purificada (Melain N) de frutos verdes de *Melia azedarach*, que possui pH ótimo 8,0 (DEMIR et al., 2009), já a protease purificada (Melain R) dos frutos amarelos maduros da *Melia azedarach* possui pH ideal entre 7,5 e 8,5 (KANEDA et al., 1994). A amostra apresentou maior atividade proteolítica à 40 °C e perdeu atividade em temperaturas acima de 70 °C. Nos ensaios de estabilidade térmica a amostra reteve atividade proteolítica após 60 minutos incubadas em diferentes temperaturas. Esse resultado sugere que em relação à atividade proteolítica, o EB do cinamomo não se desnatura em altas temperaturas. As enzimas extraídas do extrato aquoso da flor do cardo (*Cynara cardunculus*) também apresentam atividade proteolítica até 70 °C (SILVA, 2019). O resultado da temperatura ótima é semelhante ao encontrado por França-Santos e colaboradores (2009) na bromelina, enzima do extrato proteico do fruto do abacaxizeiro, amplamente utilizada na indústria farmacêutica e de alimento. Segundo Campos e colaboradores (1990), o extrato bruto da flor do cardo apresentou atividade ótima a 37 °C. A mesma temperatura encontrada para a protease Melain R dos frutos da *Melia azedarach* (KANEDA et al., 1994). Novas enzimas com potencial biotecnológico, como a espécie *Ficus johannis*, também apresentam alta estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperaturas. (AFSHARNEZHAD et al, 2019).

O pH ótimo da amostra do EB para atividade de coagulação do leite foi 5,0. Alguns autores relatam que o pH ótimo da quimosina, uma peptidase aspártica, pode variar entre 5,1 e 5,8 (KUMAR et al., 2010; MORENO & RAMOS, 2014). Enzimas de origem vegetal descritas e utilizadas na coagulação do leite para a fabricação de queijos são muito ativas em pH ácido. Segundo Domingos e colaboradores (2000), um dos 4 grupos de enzimas proteolíticas que apresentam atividade ótima em pH ácido são das proteases aspárticas. Esse grupo de enzimas possui grande importância na indústria de fabricação de queijo. As enzimas coagulantes do leite de *Cynara cardunculus* apresentam atividade máxima entre os pHs 5,1 e 5,7. Resultados similares aos da quimosina comercial (CAMPOS e tal.,1990; FADÝLOĞLU, 2001). Salehi e colaboradores (2017) ao analisarem o perfil de pH da enzima de frutos da *Withania coagulans*, encontraram alta atividade na faixa de pH 4,5 a 6,0 , com atividade ótima em pH 5,5. O extrato bruto das folhas de cinamomo teve sua atividade reduzida ou inativada em pHs maiores nos ensaios de coagulação do leite, apresentando atividade entre pH 4 e 7. Característica semelhante de enzimas da *Cynara cardunculus*, que apresentam atividade entre pH 2 e 7 e em pH alcalino perdem estabilidade (MACHADO, 2013). Nos ensaios de estabilidade em pHs diferentes para atividade coagulante do leite, a amostra obteve valores acima de 115% de atividade residual entre os pHs 4 a 10. Da mesma forma, a protease de frutos de *Withania coagulans* mostrou alta estabilidade em pH na faixa de 2,0 a 8,5, tanto para atividade proteolítica quanto atividade coagulante (SALEHI et al.; 2017). Como a amostra do EB de folhas de cinamomo não foi purificada, pode haver mais de uma proteína bioativa presente no extrato com perfis de temperatura e pHs diferentes. O pH com atividade máxima para coagulação do leite foi 5,0; porém, observa-se atividade notável em pH 7,0. González-Velázquez e colaboradores (2021) avaliaram os extratos aquosos de vários tecidos da espécie *Vallesia glabra* e os resultados sugerem a presença de várias proteases em diferentes pHs.

Para atividade coagulante, a temperatura ótima da amostra do EB foi de 50 °C, resultado que corrobora alguns trabalhos com proteases coagulantes. Lo Piero e colaboradores (2002) caracterizaram uma protease das folhas de *Lactuca sativa*, que obteve atividade ótima para coagulação do leite a 50 °C, assim como uma protease das sementes de *Oriza sativa* (ASAKURA et al.,1997). Do mesmo modo, a quimosina possui uma faixa de temperatura ótima que varia entre 30 a 50°C (KUMAR et al., 2010). Conforme os resultados para atividade proteolítica e coagulante, o extrato bruto das folhas do cinamomo, perde atividade acima de 65°C. Da mesma forma, a bromelina se desnatura entre as temperaturas 60 e 70°C (FRANÇA-SANTOS et al.; 2009). O extrato bruto da amostra de folhas de cinamomo

obteve estabilidade térmica acima de 100% de atividade relativa entre 30 e 60°C após 60 minutos de incubação. Salehi e colaboradores (2017) caracterizaram uma protease de frutos de *Withania coagulans*, obtendo a temperatura ótima de 65 ° C. Após incubação da enzima a 65°C por 60 minutos, permaneceu 73% da atividade residual. A alta estabilidade térmica é vantajosa na escolha de proteases nas aplicações industriais (ROCHA et al., 2010; SALEHI et al., 2017).

A presença de íons de cálcio e sódio podem influenciar e são importantes no processo de fabricação de queijo (AHMED et al., 2010). Por isso, foi investigado a influência de diferentes concentrações de cloreto de cálcio e cloreto de sódio nos ensaios de coagulação do leite. Na presença de cloreto de cálcio, a atividade coagulante da protease de folhas de cinamomo aumentou até atingir atividade máxima na concentração de 50mM e posteriormente houve uma tendência de declínio em concentrações maiores. Tal desempenho de concentração de CaCl₂ foi demonstrado por Leite (2016) em proteases de laticíferas. A ação do CaCl₂ influencia diretamente no tempo de coagulação, pois se comporta como agente catalisador da enzima (AHMED et al., 2010; LEITE, 2016). O íon cálcio (Ca²⁺) atua como agente neutralizante dos resíduos negativos formados após a hidrólise das proteínas do leite, possibilitando maior agregação e formação de coágulos. Em concentrações mais altas, há saturação dos resíduos negativos e o aumento da força iônica inibe a atividade (DINI et al., 2010). A presença do cloreto de sódio diminuiu a atividade coagulante da protease de folhas de cinamomo. A adição de NaCl no início do processo de coagulação pode ter influenciado a atividade das enzimas presentes na amostra. A atividade de algumas enzimas coagulantes pode ser alterada ou inibida com a adição de íons como o Na⁺ e Cl⁻ ao ensaio, pois eles podem diminuir a solubilidade da amostra e levá-la a precipitação (LEITE, 2016). Dini e colaboradores (2010) obteve resultado semelhante com *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e sugere que o aumento da força iônica tenha provocado efeito inibitório sobre a enzima.

No presente trabalho, o extrato vegetal das folhas de cinamomo não foi purificado. Apesar da maioria dos estudos da potencialidade de coagulantes vegetais avaliarem a enzima purificada, alguns trabalhos mostram resultados promissores analisando apenas o extrato bruto do tecido vegetal. Rocha e colaboradores (2010) caracterizaram uma enzima proteolítica com atividade de coagulação do leite do extrato bruto de frutos maduros de *Salpichroa organifolia*. Soares e colaboradores (2015) caracterizaram parcialmente a enzima extraída do látex da frutapão, avaliando a atividade proteolítica e coagulante do extrato bruto da planta. Os extratos aquosos de folhas, frutos e sementes da espécie *Vallesia glabra* foram avaliados e apresentaram diferentes perfis proteicos. O estudo sugeriu que as propriedades de coagulação do leite do

extrato das folhas da planta possuem potencial biotecnológico como substituto do coalho na fabricação de queijos (GONZALÉZ-VELÁZQUEZ et al., 2021). Os ensaios que avaliaram o efeito do extrato proteico de folhas de cinamomo sobre diferentes concentrações do substrato BANA serviram para elucidar a velocidade da reação enzimática e o mecanismo de ação da enzima. Através da curva de Michaelis-Menten e de sua linearização no duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, obteve-se os valores aparentes de K_m e V_{max} . As enzimas possuem um K_m característico para cada substrato e independe da concentração enzimática, desde que os ensaios sejam feitos em condições de pH e temperatura similares e o valor de V_{max} é dependente da concentração da enzima (FOGLER, 1992). Para Lehninger (1976), o K_m é usado para indicar a interação do substrato com uma enzima e quanto menor o valor de K_m , melhor é a interação. Para os valores de V_{max} , quanto maior a concentração da enzima, maior a velocidade da reação. Os valores dos parâmetros cinéticos evidenciaram a alta afinidade da protease do extrato bruto do cinamomo para o substrato BANA.

No estudo da caracterização de um coagulante vegetal é importante detectar atividade proteolítica, que possui maior inespecificidade e a atividade coagulante, específica. O resultado da razão (R) da atividade específica (ACL) sobre a atividade inespecífica (AP) sugere preliminarmente potencial coagulante na protease detectada no extrato bruto. Essa justificativa se deve ao extrato bruto possuir maior atividade coagulante do que atividade proteolítica. O valor R da amostra do EB de folhas de cinamomo foi 3,5 vezes menor que o da quimosina. Isso confirma o resultado promissor, haja vista que a amostra não está purificada. Campos e colaboradores (1990) mostraram que a enzima purificada de *Cynara cardunculus* obteve maior atividade coagulante e menor atividade proteolítica do que os extratos brutos. Uma atividade proteolítica maior tem a possibilidade de quebra excessiva das proteínas do leite, o que pode influenciar na consistência e resultar no sabor amargo dos queijos (GAJO et al., 2012). No entanto, uma proporção maior entre ACL/AP, maior potencial possuirá o coagulante (SILVA, B., 2013).

Conforme Araújo e colaboradores (2009), o cinamomo possui várias ações farmacológicas já testadas e comprovadas, como atividade antiviral, antimicrobiana, antimalarial, antiparasitária e inseticida. Essas ações são derivadas de estudos em diversos tecidos da planta, como folhas, flores e fruto. O suco da folha é anti-helmíntico, antilítico e diurético (SALIB et al., 2008). Apesar da planta não ter registros na literatura de sua potencialidade coagulante para a indústria alimentícia, já foram caracterizadas e purificadas proteinases em frutos do cinamomo, entre elas a melain N (DEMIR et al., 2009). Assim como

a espécie *C.procera* que possui o látex utilizado popularmente para diversas doenças, e já demonstrado como potencial alternativa para a quimosina comercial (LARHSINI et al.1997; LEITE,2016). A planta *Cynara cardunculus*, uma espécie do mesmo gênero da alcachofra (*Cynara scolymus*), possui diferentes tecidos com compostos bioativos utilizados na farmacologia, porém devido a presença de proteases aspárticas em sua flor, a principal atividade explorada na planta é como agente na coagulação do leite na produção de queijo (FOLGADO & ABRANCHES, 2019).

Segundo Shah e colaboradores (2014), apesar da avaliação da atividade coagulante do leite ser importante nos estudos de alternativas para substitutos de coalho, os métodos e unidades diferentes usados por diversos autores dificultam a comparação da atividade de coagulação do leite de diferentes coagulantes vegetais. Os dados apresentados nesse trabalho sugerem preliminarmente que proteínas bioativas presentes em folhas de cinamomo possuem potencial para atuar como agente coagulante na indústria alimentícia. Foi realizado a manufatura do queijo artesanal utilizando o extrato bruto das folhas de cinamomo como coagulante. Contudo, há necessidade de análises mais aprofundadas que permitam o conhecimento das demais propriedades e características que envolvam essa potencialidade.

6. CONCLUSÃO

O cinamomo é uma planta com propriedades que vão além daquelas que já são amplamente estudadas. As proteínas bioativas presentes nas folhas da planta sugerem potencial biotecnológico na substituição de coalhos. O extrato bruto da folha apresentou atividade coagulante em pHs ácidos e ampla estabilidade em diferentes faixas de pH e temperatura. Como a planta possui diversos princípios ativos é importante aprofundar as pesquisas relacionadas a sua recomendação para consumo. Outros estudos são necessários para explorar as enzimas coagulantes presentes nas folhas do cinamomo, como a purificação da enzima e caracterização para a elucidação desse suposto potencial biotecnológico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, Z. Chloroplast Proteases: Possible Regulators of Gene Expression? **Biochimie**. v.82, n.6-7, p.647-654, 2000.

AFSHARNEZHAD, M.; SHAHANGIAN, S. S.; SARIRI, R. A novel milk-clotting cysteine protease from *Ficus johannis*: Purification and characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 121, p. 173-182, 2019.

AHMED, I. A. M.; BABIKER, E. E.; MORI, N. pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds and its enzymatic action on bovine caseins. **LWT - Food Science and Technology**. v.43, p.1-6, 2010.

ALCHÉ, L. E.; FERREK, G. A.; MEO, M.; COTO, C. E.; MAIER, M. S. An antiviral meliacarpin from leaves of *Melia azedarach* L. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 58, n. 3–4, p. 215–219, 2003.

ANDRÉN, A. Milk-clotting activity of various rennets and coagulants: background and information regarding IDF Standards. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n° 332/IDF. Brussels, Belgium, p. 9-14, 1998.

ANDRÉN, A. Rennets and coagulants In **Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)**, Academic Press, London, p. 574-578, 2011.

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.

ARAÚJO, S.A.C.D.; TEIXEIRA, M.F.S.; DANTAS, T.V.M.; MELO, V.S.P.; LIMA, F.E.S.; RICARTE, A.R.F.; COSTA, E.C.; MIRANDA, A.M. Usos potenciais de *Melia azedarach* L. (Meliaceae): Um levantamento. **Arquivos do Instituto Biológico. São Paulo**, v.76, n.1, p.141-148, 2009.

ARIMA, K.; YU, J.; IWASAKI, S. Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. **Methods in Enzymology**, New York, v. 19, p. 446-459, 1970.

ARSHAD, Z; AMID, A; YUSOF, F; JASWIR, I; AHMAD, K; LOKE, S.P. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. **Applied Microbiology and biotechnology**, v. 98, p.1–15, 2014.

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, n. 4, p. 1070-1075, 1997.

BARRETT, A. J. Classification of peptidases. In: BARRETT, A. J. (ed). **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press. v.244, p.1-59, 1994.

BENEDET, H. D. Enzimas coagulantes obtidas a partir da *Endothia parasitica*, *Mucor miehei* e renina: Diferenciação em gel de ágar caseína. **B. Ceppa**, v. 11, n. 01, p. 47-52, 1993.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**.v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRUNHEROTTO, R; VENDRAMIM, J. D; ORIANI, M. A. D. G. Efeito de genótipos de tomateiro e de extratos aquosos de folhas de *Melia azedarach* e de sementes de *Azadirachta indica* sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical entomology**, Londrina , v. 39, n. 5, p. 784-791, 2010.

BURKS, K.C. *Melia azedarach*. Fact sheet prepared by the Bureau of Aquatic Plant Management. Tallahassee: **Department of Environmental Protection**, State of Florida, 1997.

CAMPOS, R.; GUERRA, R.; AGUILAR, M.; VENTURA, O.; CAMACHO, L. Chemical characterization of proteases extracted from wild thistle (*Cynara cardunculus*). **Food Chemistry**, v. 35, n. 2, p. 89-97, 1990.

COELHO, D.A.; CARROLA, T.E.P.; COUVINHAS, A.F. Improvement of certified artisan

cheese production through systemic analysis-Serra da Estrela PDO. **Sustainability**. V. 9, p.468,2017.

CRABBE, M. J. C. Rennets: general and molecular aspects. In FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. **Cheese : Chemistry, physics, and microbiology**, vol. 1 . 3^a ed. London, p.617, 2004.

DANG, R.; GEZICI, S. INVITED SPEAKER IMMUNOMODULATORY EFFECTS OF MEDICINAL PLANTS AND NATURAL PHYTOCHEMICALS IN COMBATING COVID-19. **MESMAP-6 PROCEEDINGS BOOK**, p. 12, 2020.

DEMIR, N.; NADAROĞLU, H.; DEMIR, Y. Identification of a Cysteine Protease (Melain N) from Tasbih Agaji. **Phytopharmacology and therapeutic values V**, p. 325-335, 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 indicae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). **Food Chemistry**, v.120, p.87-93, 2010.

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, 2016.

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.

EGITO, A. S.; MOTA, A. C.; MOTA, M. F.; XIMENES, A. V.; RODRIGUES, R. C. Identificação de enzimas vegetais com atividade coagulante sobre o leite para a possível

utilização na fabricação de queijos de cabra. *In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO A PESQUISA, 15., 1996, Fortaleza. Anais.* Fortaleza: UFC, p. 933, 1996.

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

FADÝLOĞLU, S. Immobilization and characterization of ficin. **Food/Nahrung**, v. 45, n. 2, p. 143-146, 2001.

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.

FOGLER, H.S. **Elements of Chemical Reaction Engineering**. New Jersey: Prentice Hall, 1992. 2^a ed., p. 838, 1992.

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.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. p.587, 2000.

FRANÇA-SANTOS, A.; ALVES, R.S.; LEITE, N.S.; FERNANDES, R.P.M. Estudos bioquímicos da enzima bromelina do Ananas comosus (abacaxi). **Scientia Plena**, v. 5, n. 11, 2009.

GARCIA, L. F.; DE SOUSA, D. F.; ERIC DE SOUZA, G. I. L. Enzimas vegetais: extração e aplicações biotecnológicas. *Infarma: Ciências Farmacêuticas*. Goiânia.v.29.p.181-198,2017.

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.

GOMES, K. D.; POLIZELLI, M. A. Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima beta-galactosidase. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 28194-28208, 2020.

GONZALÉZ-VELÁZQUEZ, D.A.; MAZORRA-MANZANO, M.A.; MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; HUERTA-OCAMPO, J.A.; VALLEJO-CÓRDOBA, B.; MORA-CORTES, W.G.; MORENO-HERNÁNDEZ, J.M.; RAMÍREZ-SUAREZ, J.C. Exploring the Milk-Clotting and Proteolytic Activities in Different Tissues of *Vallesia glabra*: a New Source of Plant Proteolytic Enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.193, n.2, p.389-404, 2021.

GUINÉ, R.P.F.; FONTES, L.; LIMA, M. J. R. Cinética de secagem e propriedades de transferência de massa para a secagem da flor de cardo. *Brazilian Journal of Food Technology*, 2019, 22. 2019.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15-32, 2002.

HAQ, S. K.; ATIF, S.M.; KHAN, R.H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 431, p. 145-159, 2004.

HARBOE, M.; BROE, M. L.; QVIST, K. B. The production, action and application of rennet and coagulants. In: LAW, B. A.; TAMIME, A. Y. (ed.). **Technology of cheesemaking**. Blackwell Publishing, 2^a ed.p.482, 2010.

HASHIM, M. M. H.; IQBAL, M. F.; XIAOHONG, C.; MINGSHENG, B. Impact of processing consitions 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.

HISLOP, D. B. Enzymatic coagulation of milk. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Advanced dairy chemistry**. v.1: Proteins, 3^a ed., part B. p.713, 2003.

HOSSEINI, Saeideh. A review of antiviral potential of phytochemicals from medicinal herbs. 2020.

JACOB, M.; JAROS, D.; ROHM, H. Recent advances in milk clotting enzymes. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 1, p. 14-33, 2011.

KANEDA, M., ARIMA, K., YONEZAWA, H., UCHIKOBA, T., Purification and properties of a protease from the sarcocarp of bead tree fruit. **Phytochemistry**, v. 35, p.1395, 1994.

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

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.

KUMAR, S.; SHARMA N.S.; SAHARAN M.R.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1701-1705, 2005.

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.

LARHSINI, M.; BOUSAID, M.; LAZREK, H. B.; JANA, M.; AMAROUCH, H. Evaluation of antifungal and molluscicidal properties of extracts of *Calotropis procera*. *Fitoterapia*, v.68, p.371-373, 1997.

LEHNINGER, A.L. **Bioquímica**. São Paulo. 2ª Ed. Vol. 1. p. 127-136, 1976.

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

LO PIERO, A.R.; PUGLISI, I.; PETRONE, G. Characterization of “Lettucine”, a serine-like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 8, p. 2439-2443, 2002.

LORENZI, H. **Árvores exóticas do Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2003.

LOVATTO, P.; MARTINEZ, E.; MAUCH, C. e SCHIEDECK, G. A utilização da espécie *Melia azedarach* L. (Meliaceae) como alternativa à produção de insumos ecológicos na região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 7, 137–149, 2012.

LUCEY, J.; KELLY, J. Cheese yield. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 47, n.01, p. 1-14, 1994.

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

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

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.; PÉREZ, M. D. J. B.; OSUNA-RUIZ, I.; SALAZAR-LEYVA, J. A.; RAMIREZ-SUAREZ, J. C., & MAZORRA-MANZANO, M. Á. Exploring the milk-clotting properties of extracts from *Bromelia pinguin* fruit. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2021, 62-66,2021.

NAGODAWITHANA, T.; REED, G. **Enzymes in Food Processing**. NY: Academic Press Inc.3 ed., 1993.

OELRICHS, P.B.; HILL, M.W.; VALLELY, P.J.; MACLEOD, J.K.; MOLINSK, I T.F. Toxic tetranoortriterpenoids of the fruit of *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 531-534, 1983.

OLIVEIRA, A.S.; XAVIER, F. J.; SALES, M.P. Cysteine Proteinases and Cystatins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 91–104, 2003.

OLIVEIRA, M.D.; PERETTI, C.; BUDKE, J.C.; SANTOS, S.C.D.; CORAZZA, T.; GOMES, S.; QUADROS, F.R.D.; DECIAN, V.S.; ZANIN, M.E. Reflexos da evolução urbana sobre a arborização em Erechim, Sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, v.8, n.2, p.86-103, 2013.

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.

REOLON-COSTA, A. D.; GRANDO, M. F.; CRAVERO, V. P. Alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori): Alimento funcional e fonte de compostos promotores da saúde. **Revista Fitos**, v.10, n.4, p.526-538, 2017.

ROCHA, G. F.; FERNANDEZ, G.; PARISI, M. G. Estudios de Caracterización Cinética y Físicoquímica de una Proteínasa Aspártica Aislada de Frutos Maduros de *Salpichroa organifolia*. **Información tecnológica**, La Serena , v. 21, n. 2, p. 21-28, 2010.

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.

SALIB, J. Y.; MICHAEL, H. N.; EL-NOGOUMY, S. I. New lactoyl glycoside Quercetin from *Melia azedarach* leaves. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 44, n. 1, p. 13-15, 2008.

SARDINAS, J. L. Microbial rennets. In: PERLMAN, D. (ed.). **Advances in Applied Microbiology**. Academic Press, 1972. v.15, p. 39-73, 1972.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SHAH, M. A.; MIR, S. A.; PARAY, M. A. Plant proteases as milk-clotting enzymes incheesemaking: A review. **Dairy Science and Technology**, v. 94, n.1, p. 5–16, 2014.

SHATA, H. M. A. Extraction of Milk-clotting Enzyme Produced by Solid State Fermentation of *Aspergillus oryzae*. **Polish Journal of Microbiology**, v. 54, p. 241- 247, 2005.

SILVA, B. L. D. Produção e caracterização da protease coagulante obtida por fermentação submersa a partir do fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. 2013. 70f. Dissertação de Mestrado – UNESP, São José do Rio Preto, 2013.

SILVA, E. T. **Estabilização de proteases para aplicação tecnológica**. Dissertação de Mestrado, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2013.

SILVA, G. A. D.; ALMEIDA, W. E.S.; CORTES, M.S.; MARTINS, E.S. Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v.03, p. 28-41, 2009.

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.

SILVA, V. C.R.D. **Influência da diversidade genética da flor de cardo nas propriedades físico-químicas do queijo de Évora**. 2019. Dissertação de Mestrado - Instituto Politécnico de Beja, Escola Superior Agrária, Beja – Portugal, 2019.

SIQUEIRA-JUNIOR, C. L.; FERNANDES, K. V. S.; MACHADO, O. L. T.; CUNHA, M. D.A; GOMES, V. M.; MOURA, D.; JACINTO, T. 87 kDa tomato cystatin exhibits properties of a defense protein and forms protein crystals in prosystemin overexpressing transgenic plants. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 40, n. 3, p. 247–254, 2002.

SCOTT, R.; SCOTT, J.E.; ROBINSON, R.K.; WILBEY, R.A. **Cheesemaking practice**.3.ed. New York. Springer Science & Business Media .p.449, 1998.

SOARES, E. F.; SILVA, A. C. D.; QUEIROZ, A. E. S. D. F.; GOMES, J. E. G.; HERCULANO, P. N.; MOREIRA, K. A. Potencial do látex da fruta pão (*Artocarpus altilis*) como agente coagulante do leite. **Ciência Rural**. v. 45, n. 1, p. 149-154, 2015.

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.

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.

TORNERO, P.; CONEJERO, V.; VERA, P. Identification of a new pathogen-induced member of the subtilisin-like processing protease family from plants. **Journal of Biological Chemistry**. v.272, p.14412–14419, 1997.

TYMOSZUK, D.; WISZNIEWSKA, M.; WALUSIAK-SKORUPA, J. Papain induced occupational rhinoconjunctivitis and asthma - A case report. **Medycyna Pracy**, v.67, n.1, p. 109-112, 2016.

UCHIKOBA, T; YONEZAWA, H.; SHIMADA, M.; KANEDA, M. Melain G, a cysteine protease from green fruits of the bead tree, *Melia azedarach*: a protease affected by specific amino acids at P3 position. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**.v. 1430, n.1, p. 84-94, 1999.

VAN DER HOORN, R.A.L; JONES, J.D.G. The plant proteolytic machinery and its role in defence. **Current Opinion in plant biology**, v.7, p.400-407, 2004.

VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. Plantas Inseticidas. In: SIMÕES, C. M. O., coord. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. Da UFSC. p.739- 754, 1999.

VISSER, S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. **Journal of Dairy Science**.v. 76, p. 329 – 350, 1993.

WALTER, H. E. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrate. In: Bergmeyer, H.U. (Ed). *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie, v. 5, p.270-277, 1984.

WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, Inc, p.625, 1994.

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.