

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
(UNIRIO)

JULYANNE DANTAS DE OLIVEIRA

DETECÇÃO DA ATIVIDADE DE UMA PROTEASE COM POTENCIAL MILK
CLOTTING EM SEMENTES DE NONI (*Morinda citrifolia*)

Rio de Janeiro
2021

JULYANNE DANTAS DE OLIVEIRA

DETECÇÃO DA ATIVIDADE DE UMA PROTEASE COM POTENCIAL MILK
CLOTTING EM SEMENTES DE NONI (*Morinda citrifolia*)

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. César Luis Siqueira Junior

Rio de Janeiro
2021

ficha catalográfica

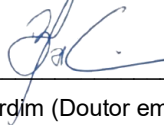
JULYANNE DANTAS DE OLIVEIRA

**DETECÇÃO DA ATIVIDADE DE UMA PROTEASE COM POTENCIAL MILK
CLOTTING EM SEMENTES DE NONI (*Morinda citrifolia*)**

Monografia apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade
Federal do Estado do Rio de Janeiro
como requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências
Biológicas

Aprovada em 04 de fevereiro de 2021.

BANCA EXAMINADORA



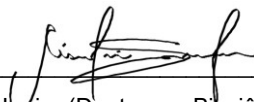
Prof. Bruno de Castro Jardim (Doutor em Biociências e Biotecnologia) - (IFF)



Prof. Dr. Pedro Carvalho de Castilho
Vice-Chefe do Departamento de Bioquímica
SIAPE: 1279583

Prof. Pedro Carvalho de Castilho
Físico-Biológico - B - UNIRIO
Coord. do Departamento de Bioquímica
SIAPE: 1279583

Prof. Pedro Carvalho de Castilho (Doutor em Ciências - Fisiologia Geral) - (UNIRIO)



Prof. César Luis Siqueira Junior (Doutor em Biociências e Biotecnologia) - (UNIRIO)

Orientador

*Dedico este trabalho à minha mãe,
à minha avó, à memória do meu avô,
e a todas as pessoas que eu amo.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por ter permitido a realização de mais esse sonho, por ter me dado a força e a determinação necessária para vencer todos os obstáculos durante essa jornada.

À pessoa mais importante da minha vida, minha mãe, gostaria de agradecer por todo apoio e incentivo acadêmico ao longo da minha vida. Você sempre acreditou que eu poderia chegar longe, sempre confiou em mim e na minha determinação. Nenhum esforço foi em vão ou passará em branco, eu prometo! Obrigada por tudo! Amo você.

Aos meus avós maternos, dona Eleuza e seu Nilson, que foram pilares importantíssimos para minha formação acadêmica e também como pessoa, muito obrigada. Sem vocês isso tudo não seria possível. Sei que o senhor está cuidando de mim aí de cima. Amo vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. César o meu muito obrigada! Por aceitar essa missão de me orientar e me guiar por essa estrada, e ter feito com muito zelo e dedicação. Você foi peça fundamental para que esse propósito fosse concluído. Obrigada por ter confiado em meu potencial desde o início, mesmo com as adversidades encontradas em meio a pandemia.

Também agradeço à banca examinadora, por terem aceitado participar desse momento. Obrigada Prof. Pedro Castilho e Prof. Bruno de Castro pela disponibilidade!

Gostaria de agradecer minha amiga Chayenne Moraes por toda parceria e amizade, por cada momento de alegria e de sufoco que compartilhamos. A sua presença fez toda a diferença. Fico imensamente feliz por saber que isso é só o começo da nossa trajetória brilhante. Você vai longe. Só nós sabemos tudo que tivemos que enfrentar para chegar até aqui.

Brian Leite, Lorena Affonso, Carina Almeida, vocês foram excepcionais. Muito obrigada amigos pela caminhada que fizemos juntos nesse período e por todas as experiências compartilhadas.

Obrigada dinda Eliane, dindo Sandro e tia Viviane por todo amparo que sempre me deram, possibilitando também que esse sonho pudesse se tornar realidade.

Jéssica Carvalho, Anna Carolina Fernandes, Jullia Dantas, Guilherme Sabino, Christian Guilherme vocês foram essenciais! Me deram força, apoio, me fizeram acreditar que isso seria possível. A amizade de fato tem um poder transformador. Vocês tiveram esse papel, me transformaram em alguém com confiança e coragem. Amo muito vocês.

Agradeço a todos que torcem por mim e pela minha vitória! Eu consegui!

RESUMO

O queijo é produzido pela ação de coagulantes de leite, sendo a quimosina a enzima proteolítica mais utilizada mundialmente no processo de fabricação deste produto. Ela é encontrada em um complexo de enzimas no quarto estômago de ruminantes juvenis, contudo, a procedência animal e as problemáticas envolvidas no uso da quimosina gerou uma busca por fontes enzimáticas alternativas, e dentre essas opções encontram-se as plantas. Estas vêm sendo utilizadas como matéria-prima por diferentes povos e culturas, sendo os seus compostos bioativos os responsáveis por variados benefícios. As proteases são um grupo de moléculas que apresentam caráter bioativo que são encontradas nos organismos vivos, e em destaque as plantas, e compreendem um grupo de enzimas que catalisam reações essenciais de diversos tipos. A planta noni, denominada cientificamente como *Morinda citrifolia*, é pertencente à família Rubiaceae, de origem do sudoeste da Ásia. O suco feito com o fruto é bastante utilizado na fitoterapia em combate a diversos tipos de enfermidades, enquanto que a semente geralmente é descartada. O objetivo deste trabalho foi buscar proteases ativas em sementes de noni, caracterizando a atividade biológica proteolítica e coagulante de leite. Foram utilizados ensaios enzimáticos com caseína e extrato bruto de sementes de noni para detecção e determinação de atividade proteolítica. Também foram realizados experimentos para avaliar a atividade coagulante de leite, utilizando-se leite em pó desnatado e extrato bruto de sementes de noni. Como resultado, foi demonstrada a presença de uma protease produzida constitutivamente em sementes de noni, que possui atividade catalítica sobre a caseína de 1.587,6 UAP/mg e atividade coagulante de leite com MCA de 2.635,2 US/ml obtido em sua temperatura ótima em 65°C. Foi possível constatar razão de MCA/PA de 1,66. As propriedades de atividade coagulante de leite do extrato bruto proteico de sementes de *Morinda citrifolia* endossa o seu potencial de promissora fonte natural vegetal de enzimas proteolíticas com potencial biotecnológico para aplicação na indústria de fabricação de queijo.

Palavras-chave: noni, protease, milk-clotting

ABSTRACT

Cheese is produced by the action of milk coagulants, with chymosin being the most used proteolytic enzyme worldwide in the manufacturing process of this product. It is found in an enzyme complex from the fourth stomach of juvenile ruminants, however, the animal origin and the problems involved in the use of chymosin generated a search for alternative enzymatic sources, and among these options are plants. These have been used as raw material by different people and cultures, with their bioactive compounds responsible for various benefits. Proteases are a group of molecules that have a bioactive character that are found in living organisms, especially plants, and comprise a group of enzymes that catalyze essential reactions of different types. The noni plant, scientifically known as *Morinda citrifolia*, belongs to the Rubiaceae family, of Southwest Asia origin. The juice made with the fruit is widely used in phytotherapy to combat various types of diseases, while the seed is usually discarded. The objective of this work was to search for active proteases in noni seeds, characterizing the proteolytic and milk-clotting biological activities. Enzymatic assays with casein and crude extract of noni seeds were used to detect and determine proteolytic activity. Experiments were also carried out to evaluate the milk-clotting activity, using skimmed-milk powder and crude extract of noni seeds. As a result, it was demonstrated the presence of a protease produced constitutively in noni seeds, which has catalytic activity on the casein of 1.587,6 UAP/mg and milk-clotting activity with MCA of 2.635,2 US/ml obtained at its optimum temperature at 65°C. It was possible to verify an MCA/PA ratio of 1,66. The properties of milk clotting activity of crude protein extract of *Morinda citrifolia* seeds endorse its potential as a promising natural vegetable source of proteolytic enzymes with biotechnological potential for application in the cheese making industry.

Keywords: noni, protease, milk-clotting

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Local de clivagem na molécula de κ -caseína pela enzima quimosina	16
Figura 2: <i>Morinda citrifolia</i>	20
Figura 3: Fruto de <i>M. citrifolia</i>	21
Figura 4: Análise qualitativa da presença de proteases coagulante de leite em sementes de noni	28
Figura 5: Avaliação da atividade coagulante de leite por proteases presentes em sementes de noni	29
Figura 6: Efeito da variação de temperatura sobre a atividade coagulante de leite das proteases de sementes de noni	30
Figura 7: Avaliação da atividade proteolítica de proteases no EB de sementes de <i>M. citrifolia</i>	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade coagulante de leite e atividade proteolítica específica em EB de sementes de <i>M. citrifolia</i>	33
---	----

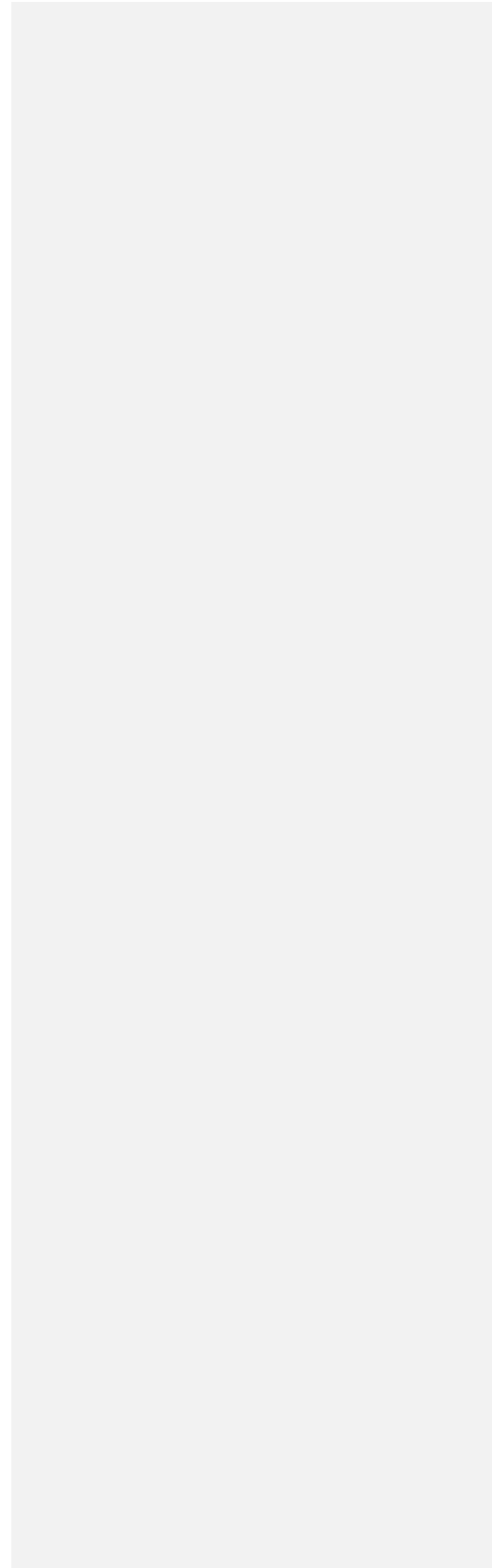
LISTA DE ABREVIATURAS

BSA — Albumina de soro bovino
EB — Extrato bruto proteico
g — Grama
HCl — Ácido clorídrico
L — Litro
M — Molaridade
MCA — *Milk-clotting activity (Atividade coagulante de leite)*
Met — Metionina
mg — Miligrama
ml — Mililitro
mM — Milimolar
nm — Nanômetro
PA — *Proteolytic Activity (Atividade proteolítica)*
Phe — Fenilalanina
PVPK — Polivinilpirrolidona
Ser — Serina
TCA — Ácido tricloroacético
Tris — Tris(hidroximetil)aminometano
UAP — Unidade de Atividade Proteolítica
US — Unidade Soxhlet

LISTA DE SÍMBOLOS

κ — Kappa

μ — Micro



SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	15
1.1 A produção de queijo	15
1.2 Os vegetais e as suas proteases	17
1.3 Atividade e aplicações das proteases	18
1.4 A planta noni (<i>Morinda citrifolia</i>)	19
1.5 Frutos e sementes de <i>M. citrifolia</i>	20
1.6 Aplicações de <i>M. citrifolia</i>	21
2.0 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS	
24	
3.1 Extração de proteínas de tecido vegetal	
24	
3.2 Dosagem de proteínas	
24	
3.3 Detecção da atividade coagulante de leite	
24	
3.4 Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade biológica da protease de sementes de noni	
26	
3.5 Detecção da atividade proteolítica de proteases presentes no extrato de sementes de noni	26
4.0 RESULTADOS	
28	
4.1 Detecção da atividade coagulante de leite	
28	
4.2 Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade biológica da protease de sementes de noni	
30	
4.3 Detecção da atividade proteolítica de proteases presentes no extrato de sementes de noni	31

5.0 DISCUSSÃO	
34	
5.1 Detecção da atividade coagulante de leite	
34	
5.2 Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade biológica da protease de sementes de noni	
35	
5.3 Detecção da atividade proteolítica de proteases presentes no extrato de sementes de noni	
.....	36
6.0 CONCLUSÃO	
39	
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
40	

1) INTRODUÇÃO

1.1 A PRODUÇÃO DE QUEIJO

O queijo é um produto da coagulação do leite, sendo a sua descoberta possibilitada pelo armazenamento de comida em pele de animais, onde percebeu-se que acidentalmente acontecia a conversão do leite para coalho (JACOB *et al*, 2011). O leite é um fluido biológico complexo, que contém nutrientes importantes como as proteínas, água, gordura, ácido cítrico, e também compostos inorgânicos como o fosfato de cálcio (KUMAR *et al*, 2010).

O coagulante de leite mais utilizado mundialmente na fabricação de queijo é um complexo de enzimas encontrado no quarto estômago (abomaso) de ruminantes juvenis neonatais que até então foram alimentados apenas de leite materno (UNIACKE-LOWE & FOX, 2017). Esse complexo enzimático contém quimosina e pepsina em quantidades que dependem de fatores como por exemplo a alimentação e o tempo de vida desses animais (JACOB *et al*, 2011).

Essencial na etapa de coagulação de leite para produção de queijo, a caseína é uma proteína presente no leite, produzida pelas glândulas mamárias em resposta a estímulos hormonais e são secretadas agregadamente, sendo denominadas como micelas. A família das caseínas engloba a κ -caseína. Esta é constituída por 169 aminoácidos, é localizada principalmente na superfície da micela de caseína e é caracterizada por ser insensível ao cálcio, ou seja, mesmo na presença dessa molécula, a integridade e estabilidade da estrutura micelar são preservadas (SELVAGGI *et al*, 2014).

A enzima quimosina é considerada a melhor coagulante de leite e a mais utilizada pela indústria alimentícia para preparo do queijo, por conta de sua alta especificidade em hidrolisar a ligação peptídica Phe105 — Met106 na cadeia de κ -caseína (Figura 1), resultando em uma alta atividade proteolítica que desestabiliza as micelas de caseína gerando a coagulação do leite (UNIACKE-LOWE & FOX, 2017).

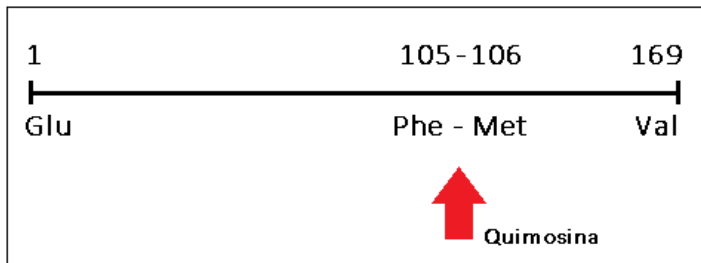


Figura 1: Local de clivagem na molécula de κ -caseína pela enzima quimosina.
 Fonte: Elaboração própria baseada em SWAISGOOD (1975).

Pelo fato da quimosina ser encontrada no estômago de ruminantes, seu uso vem sendo discutido devido à falta de aprovação pelos adeptos do vegetarianismo, por questões religiosas e culturais, pelos impactos causados ao meio ambiente decorrente do esgotamento de recursos, por se distanciar da sustentabilidade, além do alto custo financeiro e a limitação para sua utilização. Esses fatores geraram uma busca por alternativas ao seu uso, sendo assim, outras fontes enzimáticas vêm sendo pesquisadas e testadas por conta dessa polêmica (BELENKAYA *et al*, 2018).

Uma das alternativas é o coagulante microbiano, uma fonte de enzimas proteolíticas proveniente de micro-organismos, cujo mecanismo de ação ocorre similarmente ao do coagulante de fonte animal. Nesse grupo de micro-organismos encontram-se, por exemplo, bactérias (*Bacillus polymyxa*, *Bacillus mesentericus*, etc) e fungos (*Endothia parasitica*, *Rhizomucor miehei* e *Mucor pusillus* var. Lindt) (STERNBERG, 1976; SOLTANI *et al*, 2019).

Outra alternativa largamente utilizada é a quimosina recombinante, sintetizada com o emprego de técnicas de engenharia genética para produção de quimosina na sua forma natural exata proveniente de diversas fontes, como por exemplo: bactérias *E. coli* e do gênero *Bacillus*, como também fungos do gênero *Aspergillus*. A quimosina recombinante também pode ser sintetizada a partir de fontes vegetais, como foi demonstrado pelo trabalho de Wei e colaboradores (2016). Queijos populares são produzidos com tal enzima recombinante, como os tipos cheddar e muçarela (KUMAR *et al*, 2010).

A fabricação do queijo pela ação de proteases que não são provenientes de fonte animal já é bastante comum, mas a busca por coagulantes alternativos que

possuam melhores características e propriedades para a aplicação nessa área ainda persiste. Os coagulantes que apresentam a melhor qualidade e acessibilidade são fortes candidatos a preencherem os requisitos necessários para serem utilizados.

Dentre os substitutos que preenchem os requisitos necessários, encontram-se as proteases advindas das plantas. Há relatos de grande produção e variedade de queijos produzidos a partir de enzimas vegetais na Espanha e em Portugal, que utilizam, por exemplo, *Cynara sp.* — também chamada de alcachofra — como fonte de proteases (ROSEIRO *et al*, 2003; SHAH *et al*, 2014).

1.2 OS VEGETAIS E AS SUAS PROTEASES

As plantas vêm sendo utilizadas ao longo da história como matéria-prima para produtos naturais que são empregados em diversos setores por diferentes povos e culturas. As pesquisas a respeito dos extratos das plantas com potencial biotecnológico são cada vez mais crescentes por conta do fácil acesso e baixo custo para sua utilização. Esses extratos são ricos em compostos bioativos, que por sua vez são os responsáveis por executar os benefícios atribuídos às aplicações de cada planta (COSTA & ROSA, 2016).

Esses compostos bioativos são na verdade os compostos químicos encontrados em diferentes partes das plantas (raízes, folhas, polpa, sementes e etc) que podem realizar intensa atividade biológica. Podem atuar de diferentes formas, inclusive a favor da saúde humana, e devido a isso, o interesse sobre eles é cada vez mais crescente. Uma ampla gama de estudos epidemiológicos mostra que uma dieta rica em alimentos com compostos bioativos é capaz de influenciar na redução de uma variedade de riscos como por exemplo a diabetes, doenças cardiovasculares e cânceres (COZZOLINO, 2012).

Um grupo de moléculas com caráter bioativo são as proteases, que são encontradas nos organismos vivos e compreendem um grupo de enzimas que catalisam reações essenciais, sejam elas metabólicas ou de funções regulatórias como defesa, digestão, desenvolvimento, apoptose e etc (WALSH, 2015). O mecanismo de ação das proteases se dá pela hidrólise de ligações peptídicas (LI *et al*, 2013).

As proteases são subdivididas em endopeptidases e exopeptidases, de acordo com seu sítio de ação, ou seja, se clivam os peptídeos distantes dos terminais ou peptídeos terminais dos substratos, respectivamente; podendo também agir de ambas as formas (UNIACKE-LOWE & FOX, 2017). Quatro grupos distintos de proteases são reconhecidos pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, e abaixo encontra-se sua caracterização, de acordo com Bond & Butler (1987):

- serino proteases ou proteases serínicas: há a presença de uma cadeia lateral de serina reativa no centro ativo, além de haver, no mecanismo catalítico desta enzima, ligação covalente de substratos para este resíduo de serina que é produzido;
- cisteíno proteases ou proteases cisteínicas: também denominadas “tiol proteases”, este grupo de enzimas é caracterizado por conter resíduo essencial de cisteína envolvido em complexo covalente intermediário com substratos;
- aspártico proteases ou proteases aspárticas: também conhecidas como “proteases ácidas” tem como característica conter dois resíduos aspárticos no seu centro ativo envolvidos na catálise. É pensado que a catálise geral ácido-base ao invés de formar intermediários enzima-substrato atua no próprio mecanismo dessas enzimas;
- metalo proteases: contém íons metálicos (usualmente zinco) nos seus centros reativos, que aumentam a nucleofilicidade da água e polarizam a ligação peptídica a ser clivada antes do ataque nucleofílico.

1.3 ATIVIDADE E APLICAÇÕES DAS PROTEASES

As enzimas proteolíticas são consideradas como ferramentas importantes no mecanismo de defesa bioquímico de plantas. Elas atuam na defesa pré-formada, ou seja, antes mesmo do ataque do patógeno algumas proteases já são produzidas constitutivamente pela planta. As proteases são muito importantes e abundantes pois estão presentes além das plantas, como em todas as formas de organismos vivos (TREMACOLDI, 2009).

Desempenhando papéis relevantes em mais de um aspecto — sustentável e econômico — as proteases são biodegradáveis e provenientes de fontes renováveis, sendo consideradas de baixo impacto ambiental, decorrente de uma baixa geração de resíduos (SHELDON & VAN PELT, 2013). Somado a isso, o fato de realizarem atividade para além do seu organismo de origem — vegetais, animais e micro-organismos — as proteases são colocadas em posição de destaque nas indústrias farmacêutica, alimentícia (amaciamento de carne, produção de bebidas, confeitaria), de detergente, no processamento de couro, etc (WALSH, 2015).

Portanto, o interesse econômico acerca das proteases se deve grandemente a essas características, que as tornam fortes candidatas em potencial, nessa busca por novas fontes enzimáticas (KUMAR *et al*, 2008).

Dentre as diversas aplicações dessas enzimas proteolíticas, encontra-se a coagulação do leite e preparo de queijo, que se dá pela ação da protease sobre as proteínas do leite, onde há hidrólise da ligação peptídica entre os aminoácidos Phe105 — Met106 na cadeia de κ -caseína (SELVAGGI *et al*, 2014). Há exceção de uma protease de *Cryphonectria parasitica* que cliva a ligação Ser104 — Phe105 (JACOB *et al*, 2011).

Por conta dos problemas já descritos acima, relacionados ao uso industrial de enzimas provenientes de fontes animais, os holofotes se voltaram para as proteases de origem vegetal, que vêm sendo estudadas e testadas, por realizarem atividade proteolítica mesmo em condições adversas como em presença de agentes desnaturantes, solventes, diferentes amplitudes de temperatura e pH e etc (LI *et al*, 2013).

Em 2018, a produção mundial de enzimas industriais bateu a marca de US\$5,5 bilhões, conforme cálculos realizados pela “BBC research”, alcançará o número de US\$7,0 bilhões até 2023 (MAGALHÃES *et al*, 2019).

1.4 A PLANTA NONI (*Morinda citrifolia*)

Conhecida popularmente como “noni” e denominada cientificamente como *Morinda citrifolia* L., a planta é pertencente à família Rubiaceae, com característica de arbusto, com folhas elípticas e inflorescências brancas, originária do sudoeste da Ásia,

que vem sendo utilizada pela população há pelo menos 2000 anos na Polinésia. Atualmente pode ser encontrada em diversos lugares, como na África, Caribe, Austrália, Malásia, Indonésia e Américas do Sul e Central (WANG *et al*, 2002; CHAN-BLANCO *et al*, 2006; CORREIA *et al*, 2012).



Figura 2: *Morinda citrifolia*.
Fonte: Daiji World (2020).

1.5 FRUTOS E SEMENTES DE *M. citrifolia*

O fruto de *M. citrifolia* possui um odor característico com sensação olfativa pouco agradável que se intensifica quando maduro, tendo formato ovóide, podendo chegar a 10 centímetros de comprimento e 6 centímetros de largura. Possui polpa esbranquiçada carnosa e succulenta e uma superfície verde grumosa discretamente enrugada, dividida em seções de formato poligonal (CHAN-BLANCO *et al*, 2006).

Cada fruto comporta diversas sementes, que são de coloração escura e alongadas (WANG *et al*, 2002). O suco feito com o fruto é bastante utilizado pela população como fitoterápico, almejando o combate a diversos tipos de enfermidades, enquanto que as sementes geralmente são descartadas.



Figura 3: Fruto de *M. citrifolia*.
Fonte: Alimentos, (2020).

1.6 APLICAÇÕES DE *M. citrifolia*

Segundo Correia e colaboradores (2012), na cultura popular alega-se que o fruto de noni além de prevenir, também cura diversas enfermidades. O seu suco é consumido como suplemento alimentar, porém, quase todas as partes da planta são aproveitadas para consumo, sendo relacionadas com benefícios distintos. O fruto é a parte da planta mais utilizada, com aplicações bactericida, analgésico, antioxidante, anti-inflamatório, hipotensor, purificador do sangue, etc (ABOU ASSI *et al*, 2015).

Utilizada para estimular o sistema imunológico, acredita-se que combata bactérias, infecções virais, fúngicas, parasitárias e inflamações. Além disso, também é reconhecida como agente poderoso contra diabetes, pressão alta, dores musculares, assim como, também atua como agente anti-tumoral (WANG *et al*, 2002; ABOU ASSI *et al*, 2015). Baseado nessas informações, começou-se a pesquisar as propriedades terapêuticas do noni, com objetivo de comprovar cientificamente tais credences populares, porém, poucas são as informações relacionadas às características bioquímicas e nutricionais já alcançadas em relação a polpa e sementes.

Existem muitas frutas e hortaliças que além de possuírem valor nutricional também realizam atividade fisiológica benéfica (COSTA & ROSA, 2016). Contudo, muitas plantas apesar de serem utilizadas pela população em função das suas propriedades terapêuticas também podem ocasionalmente causar riscos à saúde. Os riscos e benefícios do uso dessas substâncias são levados em consideração, de forma que os benefícios sejam maiores que os efeitos colaterais. Plantas produzem compostos tóxicos em grandes quantidades que devem ser usadas para defesa primária contra ataques de fungos, bactérias, insetos e outros predadores (VARANDA, 2006).

Nos últimos anos vários compostos bioativos já foram isolados de extratos advindos do noni. Entre estes pode-se citar: vitaminas, antraquinonas, flavonóides, glicosídeos e ácidos graxos poliinsaturados (WANG *et al*, 2002).

Um estudo realizado para avaliar o potencial de risco à saúde do extrato de sementes de noni constatou que as amostras não demonstraram atividade citotóxica, bem como não demonstraram toxicidade oral no sistema teste utilizado. Os experimentos realizados para avaliar o possível dano causado ao DNA não indicaram nenhum potencial genotóxico relacionado ao consumo de extrato de sementes de *M. citrifolia* (WEST *et al*, 2011).

Entretanto, o pronunciamento da ANVISA de cunho oficial a respeito da utilização do noni diz que devido à falta de histórico de consumo no país, a comercialização de qualquer alimento contendo noni só será permitida após prévia confirmação de sua segurança de uso e registro, de acordo com as determinações da Resolução nº. 16/1999 e da Resolução RDC nº. 278/2005 (BARBOSA *et al*, 2017).

Tendo em vista esses cenários, o presente trabalho tem como objetivo buscar proteases presentes nas sementes de noni e caracterizar a atividade dessas moléculas evidenciando seu potencial biotecnológico.

2) OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Detectar proteases bioativas produzidas em sementes de *Morinda citrifolia* e avaliar a atividade proteolítica e coagulante de leite dessa protease.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Detectar atividade proteolítica em extrato bruto de sementes de noni;
- Detectar a atividade coagulante de leite em extrato bruto de semente de noni;
- Avaliar o efeito da temperatura sobre a atividade coagulante de leite da protease detectada em sementes de noni;

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE TECIDO VEGETAL

Sementes de noni foram obtidas a partir de frutos coletados nos municípios do Rio de Janeiro e Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

As sementes foram separadas da polpa e utilizadas para a extração das proteínas, as quais foram extraídas triturando-se as sementes em tampão de extração Tris HCl 50 mM (pH 6), na proporção de 5 ml de tampão de extração para cada 1 grama de sementes (5:1), ao qual foi adicionado 10% (do peso fresco das sementes) de PVPK-30. A mistura foi mantida em agitação vigorosa por 1 hora e 30 minutos a 4°C e, em seguida, centrifugada a 12.000 xg por 30 minutos na mesma temperatura.

O material sedimentado foi descartado enquanto que o sobrenadante foi utilizado como solução contendo proteínas, o qual foi denominado extrato bruto proteico (EB).

3.2 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas foi realizada segundo a metodologia de Bradford (1976).

Para construção da curva padrão, 10 µg/µl da proteína BSA foram distribuídas em tubos de microcentrífuga de 2,0 ml nas concentrações de 0 µg, 2 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg e 10 µg, onde foram adicionados individualmente 200 µl de água MilliQ e 800 µl de reagente Bradford. As amostras foram analisadas por espectrofotômetro a 595 nm.

Para a dosagem das proteínas das amostras, foram usados volumes diferentes de EB e comparados os valores com os da curva padrão.

3.3 DETECÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE DE LEITE

Os ensaios de detecção da atividade coagulante de leite (do inglês *milk-clotting*) foram realizados baseando-se na metodologia descrita por Arima e colaboradores (1970).

O tampão de ensaio cloreto de cálcio 10 mM (pH 6,5) foi utilizado para dissolver leite em pó (desnatado) a uma concentração de 10% (m/v), utilizado como substrato. Em tubos de microcentrifuga, foram distribuídos 900 µl de solução de leite aos quais foram adicionados 100 µl de EB. Os tubos foram mantidos em banho maria à 50°C e o tempo de “clotting” (t) foi definido como o tempo decorrido entre o início da incubação em banho-maria à 50°C e o aparecimento do primeiro material sólido (coágulo de leite). Como controle negativo foram utilizados 100 µl de tampão de extração (descrito no item 3.1) em substituição ao EB, nas mesmas condições descritas acima. Como controle positivo foram utilizados 10 µl de quimosina (Coagulante Líquido HA-LA®) (na ausência de EB) adicionadas a 990 µl da solução de leite. Um terceiro controle experimental constitui em uso de um tubo contendo apenas a solução de leite (1000 µl) nas mesmas condições experimentais para determinar se a temperatura pode interferir na solução de leite (na ausência de enzimas proteolíticas). O resultado experimental foi expresso na forma de unidade de coagulação do leite (MCA, do inglês “*Milk Clotting Activity*”) sendo definido como a quantidade de EB (ml) necessária para a coagulação de 100 ml de leite em 40 minutos, nas condições do ensaio. Os experimentos foram realizados em triplicatas e conduzidos de forma independente.

O MCA foi calculado usando a equação a seguir e expresso em Unidade Soxhlet por ml de coagulante (US/ml):

$$MCA (US/ml) = \frac{2400}{t} \times \frac{S}{E},$$

Onde:

t = tempo de clotting (seg);

S = volume de substrato (ml);

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

3.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE BIOLÓGICA DA PROTEASE DE SEMENTES DE NONI

O efeito da temperatura sobre a atividade da protease produzida em sementes de noni foi avaliado através da mesma metodologia descrita acima. Tampão de ensaio cloreto de cálcio 10 mM (pH 6,5) foi utilizado para dissolver leite em pó (desnatado) a uma concentração de 10% (m/v), utilizado como substrato. Em tubos de microcentrífuga, foram distribuídos 900 µl de solução de leite aos quais foram adicionados 60 µg de EB e completados com tampão cloreto de cálcio para atingir 1000 µl totais. Os tubos foram mantidos em banho maria à diferentes temperaturas (30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 e 90°C) e o tempo de “clotting” (t) foi definido como o tempo decorrido entre o início da incubação em banho-maria e o aparecimento do primeiro material sólido (coágulo de leite). Como controle negativo foram utilizados 100 µl de tampão de extração, em substituição ao EB, nas mesmas condições descritas acima. Como controle positivo foram utilizados 10 µl de quimosina (Coagulante Líquido HA-LA®) (na ausência de EB) adicionadas a 990 µl da solução de leite. E novamente, um terceiro controle experimental constitui em uso de um tubo contendo apenas a solução de leite (1000 µl) nas mesmas condições experimentais para determinar possíveis interferências das temperaturas na solução de leite, mesmo na ausência de enzimas.

O MCA foi calculado tal como descrito no item 3.3.

3.5 DETECÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE PROTEASES PRESENTES NO EXTRATO DE SEMENTES DE NONI

A detecção de atividade de protease no EB das sementes foi realizada segundo modificação da metodologia descrita por Afsharnejhad e colaboradores (2018).

Caseína (Synth ®) foi diluída em tampão de ensaio fosfato de sódio monobásico 50 mM (pH 6,0) a uma concentração final de 0,1% para constituir o substrato. Em microtubos de centrífuga foram adicionados 300 µl de solução de caseína e 50 µl de EB para um volume final de 350 µl. A reação foi iniciada pela adição do EB aos tubos. Após 40 minutos de incubação em banho maria a 50°C, a reação foi

parada pela adição de 500 µl de ácido tricloroacético (TCA) 5%. Como controle negativo, em um dos tubos, o TCA 5% foi adicionado antes do EB e incubado nas mesmas condições descritas acima. Como controle positivo do ensaio, em um dos tubos, foram adicionados 50 µl de quimosina (em substituição ao EB). Após a parada de reação com 500 µl de TCA 5%, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente por mais 30 minutos. Feito isso, todas as amostras foram centrifugadas por 20 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante obtido foi analisado por espectrofotômetro à 280 nm.

Os valores obtidos foram representados como Unidade de Atividade Proteolítica (UAP), onde cada UAP foi definida como a quantidade de enzima necessária para desencadear o aumento de 0,01 na densidade ótica em 1 minuto a 280 nm sob as condições do ensaio.

4) RESULTADOS

4.1 DETECÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE DE LEITE

A coagulação do leite é uma etapa essencial na produção de queijos, podendo ser executada por proteases de fontes vegetais. Na triplicata de experimentos independentes — executados para avaliar a atividade coagulante de leite realizada pela enzima proteolítica detectada no extrato bruto das sementes de noni — foi possível observar que a protease é capaz de gerar coágulos de leite (Figura 4 – tubos 4 e 5). Ao analisar o tubo contendo apenas o tampão de extração (Figura 4 – tubo 2) constatou-se a ausência de frações do leite coaguladas, pois o leite continua exibindo a mesma textura líquida e homogênea.

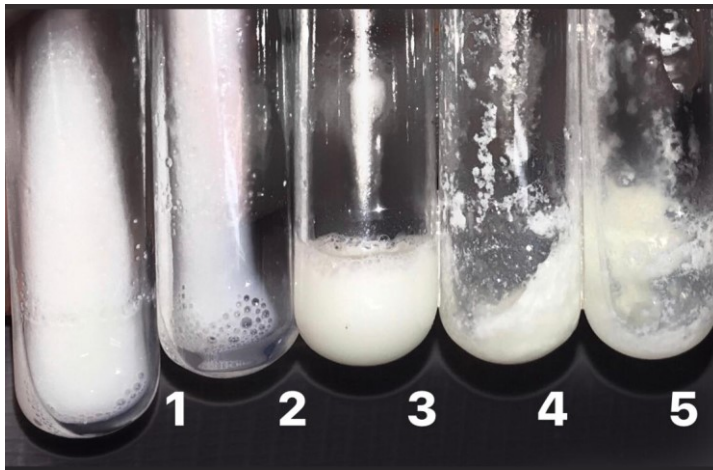


Figura 4: Análise qualitativa da presença de proteases coagulante de leite em sementes de noni: Tubo 1- Contendo apenas leite diluído em tampão de ensaio. Tubo 2- Contendo leite diluído em tampão de ensaio incubado com tampão de extração, na ausência de EB (controle -). Tubo 3- Contendo leite diluído em tampão de ensaio incubado com 10 µl quimosina (controle +). Tubos 4 e 5: Contendo leite diluído em tampão de ensaio incubado com 60 µg de EB de sementes de noni.

Na Figura 5 foi apresentado o valor de US/ml para a atividade coagulante de leite pelas proteases das sementes de noni em sua temperatura ótima, comparando-a com o valor de MCA exibido pelo tampão de extração que demonstrou nenhuma atividade coagulante de leite.

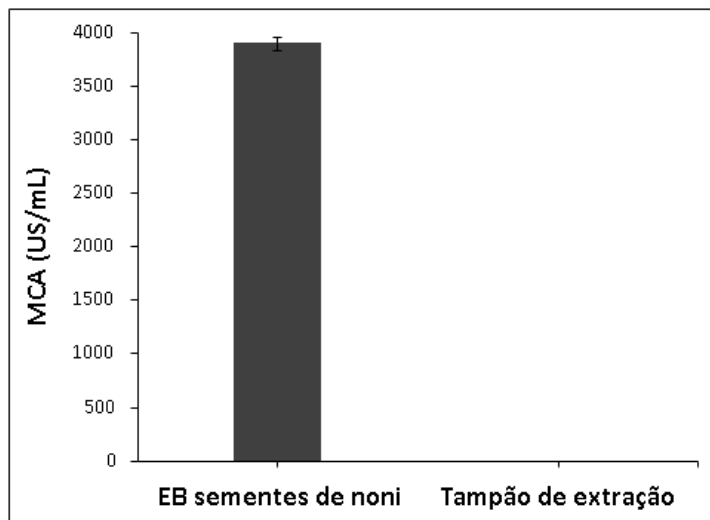


Figura 5: Avaliação da atividade coagulante de leite por proteases presentes em sementes de noni. Cada barra corresponde à média de três experimentos independentes. A reação ocorreu utilizando leite em pó desnatado 10% em tampão cloreto de cálcio 10mM pH 6,5 como substrato. A linha representada partindo da barra cinza corresponde ao desvio padrão resultante das triplicatas de experimentos.

Formatado: Fonte: 11 pt

Formatado: Fonte: 11 pt

Formatado: Fonte: 11 pt

4.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE BIOLÓGICA DA PROTEASE DE SEMENTES DE NONI

A temperatura ótima das proteases é uma característica intrínseca que pode variar entre as espécies de plantas que vêm sendo caracterizadas por estudos distintos, sendo configurada pela temperatura em que a atividade enzimática é mais proeminente. No presente estudo, para definir a temperatura ótima de atividade da protease contida em sementes de noni, três experimentos independentes foram conduzidos incubando-se a amostra em diferentes temperaturas (30-90°C), para detectar em qual faixa a atividade enzimática seria mais eficiente.

Como resultado, foi observado que em sua temperatura ótima, 1ml de leite foi coagulado com 40 µl de enzima dentro de 14 segundos. A atividade coagulante de leite aumenta drasticamente na faixa de temperatura entre 60-65°C, alcançando a atividade máxima em 65°C, onde o valor de MCA foi de 3.891,79 US/ml comparados ao valor de MCA à 55°C (65,14 US/ml). Os valores relativos em % podem ser observados na Figura 6, onde a atividade enzimática no experimento pode ser analisada.

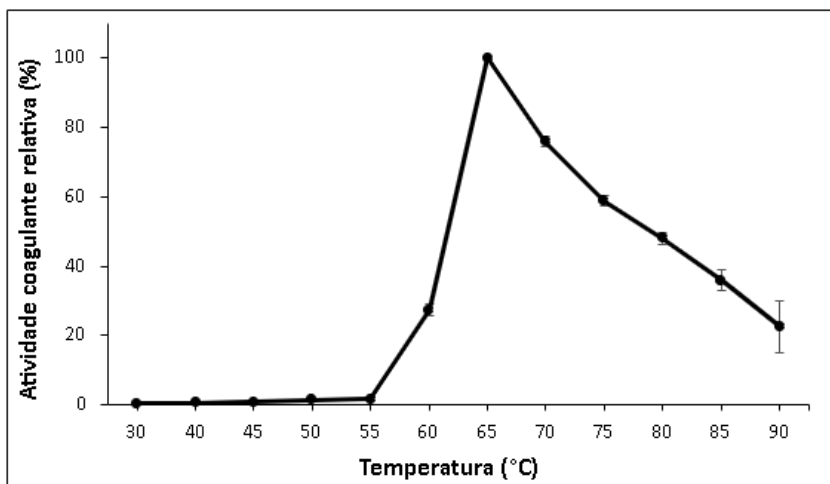


Figura 6: Efeito da variação de temperatura sobre a atividade coagulante de leite das proteases de sementes de noni. Cada ponto corresponde à média de três experimentos independentes. A reação ocorreu utilizando-se leite em pó desnatado 10% em tampão cloreto de cálcio 10mM pH 6,5 como substrato. A atividade coagulante de leite a 65°C foi tomada como 100%. As linhas representadas partindo dos pontos correspondem ao desvio padrão resultante das triplicatas de experimentos.

4.3 DETECÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE PROTEASES PRESENTES NO EXTRATO DE SEMENTES DE NONI

A atividade proteolítica é uma propriedade importantíssima detectada nas proteases, o que as caracteriza como enzimas proteolíticas. O efeito desta atividade sobre a caseína é também um fator determinante para a desestabilização das suas micelas e posteriormente, a formação dos coágulos de leite. A atividade proteolítica é significativamente importante e relacionada com a atividade coagulante de leite.

Como resultado, foi observada que a protease contida no extrato bruto de sementes de noni possui atividade proteolítica sobre a caseína, realizando a hidrólise de ligação peptídica contida nessa molécula, alcançando um valor de 1.587,6 UAP/mg. Foram realizados três experimentos independentes utilizando-se a caseína a 0,1% como substrato, na presença de EB.

A detecção da atividade caseinolítica do EB pode ser observada na Figura 7, demonstrada pela média dos três experimentos realizados, confirmando a natureza proteolítica das enzimas das sementes do fruto de noni. Pode-se observar na mesma figura que os tubos contendo caseína incubados com tampão de extração Tris-HCl (na ausência de EB) não apresentam atividade caseinolítica.

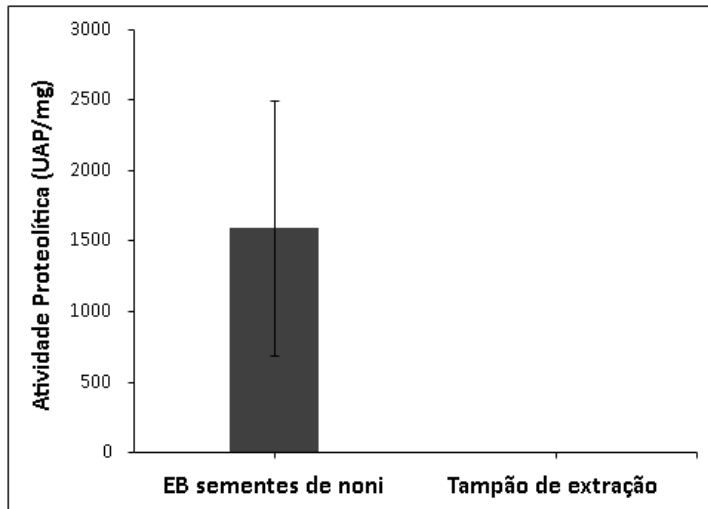


Figura 7: Avaliação da atividade proteolítica de proteases no EB de sementes de *M. citrifolia*. Os três ensaios foram realizados utilizando-se caseína 0,1% como substrato. A unidade de atividade proteolítica (UAP) foi definida como a quantidade de enzima necessária para desencadear o aumento de 0,01 na densidade ótica em 1 minuto a 280 nm (vide materiais e métodos). Cada barra representa a média de três experimentos independentes. A linha representada partindo da barra cinza corresponde ao desvio padrão resultante das triplicatas de experimentos.

Para analisar o potencial uso de uma nova fonte enzimática de coagulação de leite para ser utilizada no processo de fabricação de queijo, se faz imprescindível a determinação da atividade proteolítica (PA) por miligramas de enzima do extrato. Além da PA, a atividade coagulante de leite (MCA) também é utilizada para indicar a qualidade dos potenciais coagulantes.

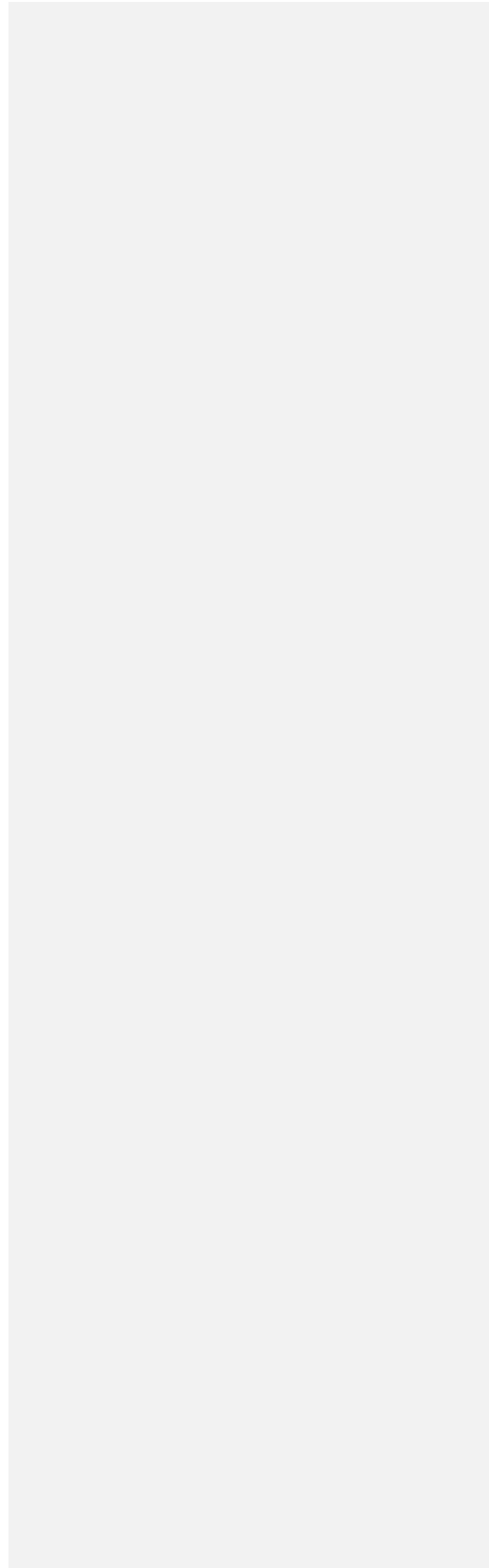
Esse parâmetro é obtido a partir da razão entre essas propriedades: MCA/PA. Esta razão indica a qualidade dos coagulantes para o uso na fabricação de queijos, sendo que quanto mais alto o valor dessa razão, melhor. O coalho comercial possui razão MCA/PA comumente mais elevado do que as outras enzimas proteolíticas.

Na Tabela 1, pode-se observar a razão MCA/PA da protease presente nas sementes de noni quando comparada à quimosina comercial, utilizada como controle positivo, em todos os experimentos. Pode-se observar que o EB apresenta uma razão de 1,66, quase sete vezes menor que a razão encontrada para a enzima quimosina (10,97). Para compor esta tabela, a atividade coagulante de leite (MCA) foi realizada em 65°C e atividade proteolítica específica (PA) em 50°C. O substrato utilizado para determinação da PA foi a caseína a 0,1%. Para determinar a razão MCA/PA foram utilizados os valores de US/mg e UAP/mg.

TABELA 1. ATIVIDADE COAGULANTE DE LEITE E ATIVIDADE PROTEOLÍTICA ESPECÍFICA EM EB DE SEMENTES DE *M. CITRIFOLIA*

Amostra	Proteínas (mg/ml)	Atividade Enzimática			Razão MCA/PA (mg)
		MCA (US/ml)	MCA (US/mg)	PA (UAP/mg)	
Sementes de noni	1,073	3891,8	2635,2	1587,6	1,66
Quimosina	0,187	47520	254117,6	23164	10,97

FONTE: Dados de pesquisa, (2021).



5) DISCUSSÃO

5.1 DETECÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE DE LEITE

Muitas partes distintas das plantas já foram estudadas e a atividade biológica de protease nelas foi detectada, demonstrando possuírem capacidade de exercer atividade coagulante de leite, como por exemplo frutos de *B. pinguin* (MORENO-HERNANDÉZ *et al*, 2017), as flores de *C. cardunculus* (MAZORRA-MANZANO *et al*, 2013b), as folhas de *M. oleifera* Lam (SHI *et al*, 2019) e as sementes de *V. glabra* (GONZÁLEZ-VELÁZQUEZ *et al*, 2020).

A respeito da planta noni, a presença de uma protease com atividade coagulante de leite já foi detectada na polpa do fruto (DE FARIAS *et al*, 2019). Contudo, esse é o primeiro relato de detecção de uma protease em sementes de noni com atividade de coagulação do leite. Além disso, a protease exibiu grande potencial de quebra da caseína, podendo gerar a coagulação do leite rapidamente, principalmente em sua temperatura ótima determinada em 65°C.

Semelhante ao leite na ausência de proteases, o tampão de extração não apresentou coágulos, o que pode ser explicado por não possuir atividade catalítica sobre a caseína, corroborando o fato de que os coágulos de leite são definitivamente gerados pela atividade da enzima proteolítica presente no extrato bruto proteico das sementes de noni.

De acordo com o trabalho realizado por De Farias e colaboradores (2019), a protease presente na polpa de noni obteve MCA específico (por miligramas) de 9950,17 US/mg, enquanto que o valor obtido pelas proteases da semente obtiveram o valor de 2635,2 US/mg. Quando comparadas, observa-se que a semente possui relativa diminuição, porém, isso não anula sua eficiência na coagulação do leite.

A temperatura padronizada para a fabricação de queijo é em torno dos 37°C, entretanto, nesse trabalho, o extrato bruto proteico de sementes de noni apresentou atividade máxima em temperatura mais elevadas, obtendo MCA máximo (100%) em torno de 65°C (3.891,79 US/ml). Numa faixa de temperatura elevada (75-80°C) o EB de *B. pinguin* apresentou MCA de 3,99 US/ml. As proteases de sementes de noni possuem MCA mais elevado que *B. pinguin* tanto em temperaturas altas,

quanto em temperaturas baixas, como na faixa de temperatura padrão de 37°C mencionada acima, onde atingiram valores de MCA respectivamente 23,81 e 1 SU/ml (MORENO-HERNÁNDEZ *et al*, 2017).

Embora o padrão de temperatura para a fabricação industrial de queijo seja na faixa dos 37°C, um grande grupo de proteases possuem melhor atividade em temperaturas acima desse valor, o que não as exclui da possibilidade de utilizá-las para este fim. É necessário que o resultado final seja satisfatório, independente da temperatura utilizada para cada protease.

5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE BIOLÓGICA DA PROTEASE DE SEMENTES DE NONI

A faixa de temperatura de 65-80°C foi onde o extrato bruto proteico de sementes de noni demonstrou um aumento na sua atividade relativa, correspondendo ao valor de MCA máximo 3.891,8 US/ml em seu 100% de atividade relativa em 65°C.

Pode-se observar resultados semelhantes em soluções enzimáticas que são consideradas novas fontes promissoras de proteases para realizar atividade coagulante de leite, como as flores de *Citrus aurantium*; os frutos de *Withania coagulans*; os frutos de *Ficus johannis*; as folhas, sementes e frutos de *Vallesia glabra*; as folhas de *Moringa oleifera* que alcançaram MCA máximo entre 65-70°C (MAZORRA-MANZANO *et al*, 2013a; SALEHI *et al*, 2017; AFSHARNEZHAD *et al*, 2018; SHI *et al*, 2019; GONZÁLEZ-VELÁZQUEZ *et al*, 2020). Temperaturas elevadas (superiores a 80°C) causaram redução na atividade coagulante do EB das sementes de noni, isso pode ser explicado devido a uma provável desnaturação das proteínas presentes no extrato bruto.

É de suma importância frisar que fatores como a temperatura, o pH e o tipo de protease envolvida nas reações podem influenciar na MCA de extratos vegetais (MAZORRA-MANZANO *et al*, 2013a). Isso indica que há situações ótimas onde a atividade da enzima é máxima, sendo necessário realizar testes para definir em quais condições a protease desempenha o seu melhor, além da necessidade de purificar o extrato bruto proteico, para avaliação da quantidade de proteases presentes que desenvolvem a atividade coagulante de leite.

Até o presente momento, este estudo é o primeiro relato sobre presença de proteases em sementes de *Morinda citrifolia* com potencial atividade milk-clotting, portanto, a atividade coagulante de leite (MCA) ainda não pode ser atribuída a uma classe de protease específica, uma vez que esta precisa ser caracterizada bioquimicamente e purificada.

Existem características relevantes a serem consideradas nas novas fontes de proteases vegetais antes da aplicação na indústria alimentícia, como é o caso do uso dessas para a produção de queijo. Essas características se referem principalmente a quantidade, o tipo e as propriedades químicas da protease em questão. Por exemplo: um extrato proteico vegetal com um baixo valor de MCA requer volumes mais altos de extrato para coagular o leite, enquanto que um alto MCA proporciona que um volume baixo de extrato seja capaz de coagular o mesmo volume de leite (MAZORRA-MANZANO *et al*, 2013a). Esta característica pode ser observada no EB de sementes de noni, onde pouco volume de extrato coagula rapidamente o leite. Conforme anteriormente citado no item 4.2, observou-se que dentro de 14 segundos 1 ml de leite é completamente coagulado por 40 µl de extrato bruto proteico de sementes de noni.

5.3 DETECÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE PROTEASES PRESENTES NO EXTRATO DE SEMENTES DE NONI

A busca por proteases produzidas constitutivamente por plantas é amplamente explorada, levando muitos estudos a testarem diferentes órgãos das plantas que indicam ser novas fontes promissoras dessas enzimas (assim como descrito no item 5.1). Neste estudo, foi constatado que as sementes de noni produzem constitutivamente uma protease que apresenta atividade proteolítica sobre a caseína, sendo este o primeiro relato dessa atividade exercida pelas sementes dessa espécie.

Quanto maior o valor da razão MCA/PA melhor é o coagulante, podendo produzir os melhores coalhos, além de amenizarem o sabor amargo e resultarem num alto rendimento do queijo. Essa característica de alta proporção MCA/PA é uma propriedade presente na quimosina.

Durante o processo de fabricação do queijo, uma baixa especificidade pode ocasionar a clivagem de outras ligações que podem gerar perda de peptídeos no soro do leite (JACOB *et al*, 2011). Portanto, a quimosina é uma referência para análise, por produzir com excelência os melhores queijos. Uma estabilidade térmica favorável também é tomada como critério de avaliação (MORENO-HERNÁNDEZ *et al*, 2017; SALEHI *et al*, 2017). Todavia, uma grande parte dos coagulantes apresentam valores altos de PA, levando a menores razões MCA/PA, resultando em queijos com defeitos na sua textura, sabores amargos e baixo rendimento (SALEHI *et al*, 2017).

O EB exibiu uma PA no valor de 1.587,6, obtendo então uma razão MCA/PA de 1,66 na sua temperatura ótima para atividade coagulante de leite em 65°. Apesar de baixo, esse valor pode ser considerado relevante, quando comparado ao obtido para proteases de outras fontes vegetais, como por exemplo, a protease do fruto de *Bromelia pinguin* que possui MCA/PA 1,29 e já foi considerada nova fonte promissora de proteases vegetais (MORENO-HERNÁNDEZ *et al*, 2017).

Em contrapartida, a protease encontrada em sementes de noni apresenta uma razão MCA/PA inferior a algumas proteases vegetais já estudadas. Por exemplo, as flores de *Cynara cardunculus*, mais especificamente a porção dos pistilos, possuem proteases que apresentam uma relação MCA/PA de 21,17 em 60°C (MAZORRA-MANZANO *et al*, 2013b). Essa espécie (*C. cardunculus*) é muito utilizada como fonte de coagulantes (dentre outras do gênero que também são usadas) na indústria do queijo (ROSEIRO *et al*, 2003; SHAH *et al*, 2014; AFSHARNEZHAD *et al*, 2018).

A eficiente produção de queijo pela protease de *C. cardunculus* se dá pela sua alta especificidade em hidrolisar a ligação peptídica Phe105 — Met106 da κ -caseína bovina, tal qual a quimosina. Uma boa atividade proteolítica sobre a caseína se dá por essa afinidade, porém, outros coagulantes podem possuir alta atividade proteolítica e serem inespecíficos, hidrolisando outras ligações peptídicas da κ -caseína que não geram bons resultados (ROSEIRO *et al*, 2003).

A razão de MCA/PA obtida neste estudo para as proteases de sementes de *M. citrifolia* é apenas 6,6 vezes menor que o da quimosina (10,97). Essa proximidade entre os valores faz com que as proteases de *M. citrifolia* seja classificada como promissora e forte candidata para se tornar uma alternativa ao uso da quimosina de origem animal, por exibir características semelhantes às do coagulante comercial.

Segundo Shi e colaboradores (2019), o extrato bruto contendo proteases provenientes das folhas de *Moringa oleifera* obteve 19,27 MCA/PA, enquanto que a

enzima purificada obteve MCA/PA de 126,76, ambas em 65°C. Pode-se observar que a purificação da protease pode impulsionar o valor de MCA/PA, fazendo com que o resultado final de todo o processo seja mais adequado. No entanto, no presente trabalho, os experimentos foram realizados com o extrato bruto, podendo então futuramente os valores de MCA/PA se elevarem e serem mais apropriados para a finalidade de coagulação do leite para produção de queijo caso os experimentos sejam realizados com a protease devidamente purificada e isolada.

A aplicação de proteases com perfis como esse não se limitam apenas à indústria do queijo, não obstante ainda possam ser utilizadas em outros campos, como foi descrito no item 1.3: nas indústrias farmacêutica, alimentícia (amacramento de carne, produção de bebidas, confeitaria), nas fábricas de detergente, no processamento de couro (WALSH, 2015). Portanto, o estudo sobre o potencial biotecnológico destas deve ser aprofundado, podendo ser empregadas com outras finalidades.

6) CONCLUSÃO

Essa é a primeira detecção de proteases produzidas constitutivamente em sementes de *M. citrifolia*, mais conhecida como noni, que apresentam alta atividade proteolítica específica e que também desempenham considerável atividade coagulante de leite. As características apresentadas pelas proteases das sementes de noni nos experimentos se mostraram semelhantes ao coagulante comercial. Essas propriedades do EB de sementes de *Morinda citrifolia* reforçam o seu uso como uma promissora fonte natural vegetal de enzimas proteolíticas com potencial biotecnológico para aplicação na indústria de fabricação de queijo. Estudos futuros explorando a purificação e caracterização do EB das sementes de noni são requeridos para elucidar questões a respeito de suas propriedades e possíveis aplicações em processos biotecnológicos distintos.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU ASSI, R. *et al*, (2015). *Morinda citrifolia (Noni): A comprehensive review on its industrial uses, pharmacological activities, and clinical trials*. Arabian Journal of Chemistry, v. 10, n. 5, p. 691-707. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.06.018>

AFSHARNEZHAD, M. *et al* (2018). *A novel milk-clotting cysteine protease from Ficus johannis: Purification and characterization*. International journal of biological macromolecules, v. 121, p. 173-182. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.006>

ARIMA, K.; YU, J; IWASAKI, S (1970). [30] *Milk-clotting enzyme from Mucor pusillus var. Lindt*. In: Methods in enzymology. Academic Press, v. 17, p. 446-459. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(70\)19033-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(70)19033-1)

BARBOSA, A. F. *et al* (2017). *Morinda citrifolia: fatos e riscos sobre o uso do noni*. Revista Fitos, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 119-249. <https://doi.org/10.5935/2446-4775.20170027>

BELENKAYA, S. V. *et al*, (2018). *Biochemical Properties of Recombinant Chymosin in Alpaca (Vicugna pacos L.)*. Applied Biochemistry and Microbiology, v. 54, n. 6, p. 569-576. DOI: 10.1134/S0003683818060054

BENEFÍCIOS do Noni para a saúde (2020). Alimentos, Brasil, 26 fev. 2020. Disponível em: <<https://alimentos.com.br/beneficios-do-noni-para-a-saude/>>. Acesso em: 21 nov. 2020.

BOND, J. S; BUTLER, P. E (1987). *Intracellular proteases*. Annual review of biochemistry, v. 56, n. 1, p. 333-364. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.002001>

BRADFORD, M. M (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

CHAN-BLANCO, Y. *et al*, (2006). *The noni fruit (Morinda citrifolia L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties*. Journal of Food Composition and Analysis, v. 19, p. 645-654. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.10.001>

- CORREIA, A. A. S. *et al* (2012). Caracterização química e físico- química da polpa do noni (*Morinda citrifolia*) cultivado no estado do Ceará. Alim. Nutr., Araraquara, v. 22, n. 4, p. 609-615.
- COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. (2016). Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos. Editora Rubio.
- COZZOLINO, S. M. F. (2012). Biodisponibilidade de Nutrientes. 4. ed. Barueri, SP, Brasil: Manole.
- DE FARIAS, V. A. *et al*, (2019). *Noni (Morinda citrifolia L.) fruit as a new source of milk-clotting cysteine proteases*. Food Research International, v. 127, p. 108689. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108689>
- GONZÁLEZ-VELÁZQUEZ, D. A. *et al*, (2020). *Exploring the Milk-Clotting and Proteolytic Activities in Different Tissues of Vallesia glabra: a New Source of Plant Proteolytic Enzymes*. Applied Biochemistry and Biotechnology. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03432-5>
- JACOB, M; JAROS, D; ROHM, H. (2011). *Recent advances in milk clotting enzymes*. International journal of dairy technology, v. 64, n. 1, p. 14-33. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x>
- LI, Qing *et al*, (2013). Commercial proteases: present and future. FEBS letters, v. 587, n. 8, p. 1155-1163. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.12.019>
- KUMAR, A. *et al*, (2010). *Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions*. Critical Reviews in Biotechnology, v. 30, n. 4, p. 243-258. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.483459>
- KUMAR, D. *et al*, (2008). *Microbial proteases and application as laundry detergent additive*. Research Journal of Microbiology, v. 3, n. 12, p. 661-672. <https://dx.doi.org/10.3923/jm.2008.661.672>
- MAGALHÃES, A. A. S., T. A. *et al*, (2019). Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* (L.) F. 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (Polyporaceae). Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais, v. 14, n. 3, p. 453-461. Disponível em: <<https://boletimcn.museu-goeldi.br/bcnaturais/article/view/231>>. Acesso em: 10 dez. 2020.

MAZORRA-MANZANO, M. A. *et al*, (2013a). *Sour orange Citrus aurantium L. flowers: A new vegetable source of milk-clotting proteases*. LWT - Food Science and Technology, v. 54, n. 2, p. 325–330. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.07.009>

MAZORRA-MANZANO, M. A. *et al*, (2013b). *Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts*. Food chemistry, v. 141, n. 3, p. 1902-1907. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.042>

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

NONI juice: The health-giving drink for greater immunity (2020). Daiji World, India, 27 jul. 2020. Disponível em: <<https://www.daijiworld.com/news/newsDisplay.aspx?newsID=734631>>. Acesso em: 25 nov. 2020.

ROSEIRO, L. B *et al*, (2003). *Cheesemaking with vegetable coagulants—the use of Cynara L. for the production of ovine milk cheeses*. International Journal of Dairy Technology, v. 56, n. 2, p. 76-85. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00080.x>

SALEHI, M. *et al*, (2017). *Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from Withania coagulans fruit*. International Journal of Biological Macromolecules, v. 98, p. 847-854. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.034>

SELVAGGI, M. *et al*, (2014). *Investigating the genetic polymorphism of sheep milk proteins: a useful tool for dairy production*. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 94, n. 15, p. 3090-3099. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6750>

SHAH, M. A. *et al*, (2014). *Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review*. Dairy Science & Technology, v. 94, n. 1, p. 5-16. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0144-3>

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. (2013). *Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how*. Chemical Society Reviews, v. 42, n. 15, p. 6223-6235. <https://doi.org/10.1039/C3CS60075K>

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

SOLTANI, Mostafa *et al*, (2019). *Effect of blends of camel chymosin and microbial rennet (Rhizomucor miehei) on chemical composition, proteolysis and residual coagulant activity in Iranian Ultrafiltered White cheese*. Journal of food science and technology, v. 56, n. 2, p. 589-598. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3513-3>

STERNBERG, M. (1976). *Microbial rennets*. In: *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, p. 135-157.

SWAISGOOD, H. (1975). *Primary sequence of kappa-casein*. Journal of dairy science, v. 58, n. 4. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(75\)84614-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(75)84614-5)

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

UNIACKE-LOWE, Therese; FOX, Patrick F. (2017). *Chymosin, pepsins and other aspartyl proteinases: Structures, functions, catalytic mechanism and milk-clotting properties*. Cheese, p. 69-113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00004-1>

VARANDA, E. A. (2006). *Atividade mutagênica de plantas medicinais*. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 27, n. 41, p. 1-7. ISSN 1808-4532

WALSH, Gary (2015). *Industrial Enzymes: Proteases and Carbohydrases*. Proteins: biochemistry and biotechnology, p. 327-369. <https://doi.org/10.1002/9781119117599.ch12>

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

WEI, Zheng-Yi *et al*, (2016). *Production of bioactive recombinant bovine chymosin in tobacco plants*. International journal of molecular sciences, v. 17, n. 5, p. 624. <https://doi.org/10.3390/ijms17050624>

WEST, Brett J. *et al*, (2011). *Toxicity and antioxidant tests of Morinda citrifolia (noni) seed extract*. Advance Journal of Food Science and Technology, v. 3, n. 4, p. 303-307.