



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**VILMARA ALBUQUERQUE DE FARIAS**

**POTENCIAL DE PEPTIDASES CISTEÍNICAS DO PURÊ DE NONI (*Morinda  
citrifolia* L.) NA HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS DO GLÚTEN DE TRIGO E  
AVALIAÇÃO DE SUA SEGURANÇA ALIMENTAR**

**FORTALEZA**

**2021**

VILMARA ALBUQUERQUE DE FARIAS

POTENCIAL DE PEPTIDASES CISTEÍNICAS DO PURÊ DE NONI (*Morinda citrifolia* L.)  
NA HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS DO GLÚTEN DE TRIGO E AVALIAÇÃO DE SUA  
SEGURANÇA ALIMENTAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira.

FORTALEZA

2021

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

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

---

- F238p Farias, Vilmara Albuquerque de.  
Potencial de peptidases cisteínicas do purê de noni (*Morinda citrifolia* L.) na hidrólise de proteínas do glúten de trigo e avaliação de sua segurança alimentar / Vilmara Albuquerque de Farias. – 2021.  
94 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2021.  
Orientação: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira.
1. *Morinda citrifolia* L. 2. Peptidase cisteínica. 3. Glúten. 4. Toxicidade oral. 5. Genotoxicidade. I.  
Título.

CDD 572

---

VILMARA ALBUQUERQUE DE FARIAS

POTENCIAL DE PEPTIDASES CISTEÍNICAS DO PURÊ DE NONI (*Morinda citrifolia* L.)  
NA HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS DO GLÚTEN DE TRIGO E AVALIAÇÃO DE SUA  
SEGURANÇA ALIMENTAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 27/07/2021.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Lucas Pinheiro Dias  
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

---

Prof. Dr. Edy Sousa de Brito  
Embrapa Agroindústria Tropical

A Deus.

A minha mãe, Maria.

Ao meu esposo, Helano.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades que me foram apresentadas na vida e por me colocar em uma família onde a educação sempre foi a principal prioridade.

À minha mãe, Maria, pelo amor incondicional e por todo cuidado dedicados a mim. Por me ensinar a ser forte, livre e independente. Por muitas vezes se anular e lutar contra todas as adversidades para garantir uma educação de qualidade para mim e minha irmã.

Ao meu esposo, Helano, pelo amor, cuidado e paciência demonstrados todos os dias. Por ser meu maior incentivador e admirador. Por me trazer leveza e equilíbrio. Por ser exemplo de constante evolução e por me fazer ver o lado simples e positivo da vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hermógenes David, por me aceitar como orientanda e me dar o privilégio de aprender em todos esses anos de convivência com seu exemplo de competência. Por demonstrar prazer e satisfação no ato de ensinar. Por sempre ter me estimulado e lutado ao meu lado para a conquista desse título.

Aos meus amigos de laboratório, com os quais sempre pude contar em todas as situações que precisei ao longo desses anos. Em especial ao Adson, pelas discussões e contribuições científicas na bancada e na construção desse trabalho. À Andréa pela parceria na execução dos experimentos. À Adrienne, por muitas vezes ir ao laboratório apenas para me ajudar na bancada. Ao meu companheiro Rodolpho, por estar todos os dias ao meu lado, contribuindo ativamente em todas as etapas deste trabalho. Sem dúvidas, dividir meus dias com vocês tornou esse período muito mais prazeroso.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Márjory Lima Holanda Araújo, Prof. Dr. Ana Paula Negreiros, Dr. Lucas Pinheiro Dias, Prof. Dr. Edy Sousa de Brito, Prof. Dr. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa e Prof. Dr. Ariclécio Cunha de Oliveira por aceitarem prontamente ao convite e pelas contribuições para o enriquecimento desse trabalho. Em especial, à Prof. Dr. Ana Paula Negreiros, pela parceria com o Laboratório de Histopatologia (NPDM) e pelo suporte e dedicação ao nosso trabalho e à Prof. Dr. Márjory Lima Holanda Araújo, por sempre ser acessível e me auxiliado sempre que precisei.

Aos meus colegas do atual Laboratório de Biotecnologia de Algas e Bioprocessos, em especial ao meu amigo Acrísio Bastos, pelo tempo em que compartilhamos o mesmo espaço e com quem sempre pude contar, além dos momentos de leveza e descontração com todos.

À Dr. Gabriela Farias, do Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, pelo suporte e treinamento com os animais de laboratório. Também aos técnicos do Biotério do NPDM por sempre serem muito solícitos e gentis.

Ao Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho e Dr. Maria Elisabete Amaral de Moraes, pela parceria e pelo suporte e infraestrutura dispensados para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti e ao Ms. Francisco Evanir Gonçalves de Lima pela parceria na realização de parte dos resultados deste trabalho. Em especial ao Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti pela atenção e suporte contínuos.

Aos membros do NPDM, Islay, Carlos e Laís, pelo constante suporte técnico prestado.

Ao Prof. Dr. Cláudio, do Laboratório de Química Medicinal, por sempre nos atender em questões junto ao NPDM, pelos treinamentos e ajuda prestados.

Às funcionárias do NPDM, Ivaneide e Simone, pela cumplicidade e gentileza em todos os dias. Também por manterem nosso ambiente de trabalho organizado e agradável.

Aos colegas e professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular por contribuírem e serem parte responsável pela minha formação durante o curso de doutorado.

À Universidade Federal Do Ceará pelas atividades de capacitação no ensino e pesquisa em Bioquímica realizadas em parceria com o Laboratório de Química Medicinal, sob a coordenação do Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira, o Laboratório de Histopatologia sob a coordenação da Prof. Dr. Ana Paula Negreiros Nunes Alves, o Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, o Laboratório de Toxicologia e Exames Laboratoriais e o Laboratório de Oncologia Experimental sob a coordenação do Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela contribuição para melhoria nas condições experimentais e formação de recursos humanos dentro do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC.

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

“Em tudo dai graças, porque esta é a vontade de Deus em Cristo Jesus para convosco.”  
(1 Tessalonicenses 5:18).



## RESUMO

Peptidases perfazem um dos grupos mais importantes do mercado de enzimas, com aplicações em vários processos industriais. Na indústria de alimentos, essas enzimas podem, inclusive, reduzir o potencial tóxico de algumas proteínas, como é o caso do glúten, cuja ingestão está associada a ativação de resposta imune em indivíduos intolerantes. Atualmente, a hidrólise enzimática representa o método mais vantajoso para a diminuição do conteúdo de glúten em alimentos em relação à hidrólise química. Contudo, peptidases vegetais ainda têm sido pouco exploradas para este propósito. Estudos prévios reportaram a presença de peptidases cisteínicas no extrato aquoso do purê de noni (*Morinda citrifolia* L.), denominado NPE (do inglês *noni puree extract*), com atividade coagulante do leite e potencial para uso na produção de queijos. O presente trabalho objetivou expandir a investigação de suas aplicações analisando o potencial de NPE na hidrólise do glúten de trigo. Toxicidade aguda, análise de toxicidade por administração em doses repetidas (subcrônica) e efeitos genotóxicos também foram avaliados visando seu uso como novo ingrediente alimentar. NPE foi capaz de hidrolisar gliadinas e gluteninas e após 4 h de reação atingiu um grau de hidrólise (DH, do inglês degree of hydrolysis) de 24.40% ( $\pm 0.09$ ) e 31.78% ( $\pm 1.28$ ), respectivamente. NPE reduziu 96.80% ( $\pm 0.10$ ) do conteúdo de gliadinas íntegras detectáveis pelo R5 ELISA com DH de 24.4% ( $\pm 0.09$ ) após 4 h. O fracionamento de NPE por meio de cromatografia de troca iônica (Source 30S) resultou em um pico não retido (P1) e apenas um pico retido (P2). Ambos os picos apresentaram atividade proteolítica, com P2 apresentando maior atividade específica ( $5.96 \pm 0.34$  U/mg) comparado a P1 ( $3.75 \pm 0.16$  U/mg). P1 e P2 apresentaram DH similar ( $p < 0.05$ ) em gliadinas ( $9.31 \pm 0.80\%$  and  $9.25 \pm 0.37\%$ , respectivamente). P1 apresentou melhor desempenho ( $p < 0.05$ ) na hidrólise de gluteninas ( $10.68 \pm 0.04\%$ ) comparado a P2 ( $8.55 \pm 0.39\%$ ). Após ensaio de digestibilidade simulada verificou-se que proteínas de NPE foram susceptíveis à ação das enzimas gastrointestinais, pepsina e tripsina. NPE não apresentou citotoxicidade pelo teste do MTT e não foi capaz de induzir quebras no DNA e formação de micronúcleos em fibroblastos murinos, respectivamente. O estudo de toxicidade aguda (80 e 160 mg/kg) e subcrônica (5, 10 e 20 mg/kg) indicou que animais tratados via oral com NPE por 28 dias não apresentaram alterações na massa corpórea, parâmetros hematológicos e bioquímicos, peso relativo e histopatologia dos órgãos analisados comparados ao controle. Esses achados sugerem que NPE é um candidato promissor para ser utilizado como um novo ingrediente alimentar seguro para a produção de alimentos *gluten-free*.

**Palavras-chave:** *Morinda citrifolia* L.; peptidase cisteínica; gluten; toxicidade oral; genotoxicidade.

## ABSTRACT

Peptidases are among the most important groups in the enzyme market, with applications in various industrial processes. Several reasons influence the use of peptidases in the food industry. They can change chemical, physical, and biological properties, including reducing the toxic potential of some food proteins, such as gluten, whose intake is associated with activation of the immune response in intolerant individuals. Currently, enzymatic hydrolysis represents a more advantageous method for gluten detoxification in foods than chemical hydrolysis. However, plant peptidases have not been extensively explored for this purpose. Previous studies have reported the presence of cysteine peptidases in the aqueous extract of noni puree (*Morinda citrifolia* L.), named NPE, with milk-clotting activity and potential to be used in cheese production. The present work aimed to expand the investigation of its applications analyzing the potential of NPE in the hydrolysis of wheat gluten. Acute toxicity, repeated dose administration toxicity analysis (subchronic), and genotoxic effects were also evaluated regarding its use as a novel food ingredient. NPE was able to hydrolyze both gliadins and glutenins, and after 4 h of reaction, it reached a degree of hydrolysis (DH) of 24.40% ( $\pm 0.09$ ) and 31.78% ( $\pm 1.28$ ), respectively. NPE reduced in 96.80% ( $\pm 0.10$ ) the intact gliadins content detectable by the R5 ELISA with DH of 24.4% ( $\pm 0.09$ ) after 4 h. Fractionation of NPE by ion-exchange chromatography (Source 30S) resulted in one unretained peak (P1) and only one retained peak (P2). Both peaks showed proteolytic activity, with P2 showing higher specific activity ( $5.96 \pm 0.34$  U/mg) than P1 ( $3.75 \pm 0.16$  U/mg). P1 and P2 displayed similar DH ( $p < 0.05$ ) in gliadins ( $9.31 \pm 0.80\%$  and  $9.25 \pm 0.37\%$ , respectively). P1 showed better performance ( $p < 0.05$ ) in glutenin hydrolysis ( $10.68 \pm 0.04\%$ ) compared to P2 ( $8.55 \pm 0.39\%$ ). After the simulated digestibility test, it was verified that NPE proteins were susceptible to the action of gastrointestinal enzymes, pepsin, and trypsin. NPE did not show cytotoxicity by MTT assay and could not induce DNA breaks and micronucleus formation in murine fibroblasts. Animals orally treated with NPE once (80 or 160 mg/kg) or for 28 days (5, 10 or 20 mg/kg) did not show changes in body mass, hematological and biochemical parameters, relative weight, and histopathology of the organs analyzed, compared to control. These findings suggest that NPE is a promising candidate for use as a new safe food ingredient for the production of gluten-free foods.

**Keywords:** *Morinda citrifolia* L.; cysteine peptidases; gluten; oral toxicity; genotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	-	Nomenclatura da interação peptidase-substrato.....	15
Figura 2	-	Mecanismos de clivagem das classes catalíticas de peptidases.....	16
Figura 3	-	Relação da degradômica com os campos da proteômica e genômica e do degradoma com o proteoma e o genoma.....	18
Figura 4	-	Representação de proteínas do glúten.....	22
Figura 5	-	Mapeamento de motivos de $\alpha$ -gliadina.....	23
Figura 6	-	Doença celíaca.....	27
Figura 7	-	Preços médios por categoria de produtos alimentares e percentagem de diferença de preço.....	29
Figura 8	-	Visão geral dos locais de clivagem enzimática do peptídeo 33-mer de $\alpha$ 2-gliadina.....	31
Figura 9	-	Visão geral dos aspectos morfológicos de <i>Morinda citrifolia</i> L.....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

33-mer	33-monômeros (sequência de 33 resíduos de aminoácidos)
AIEDA	Anafilaxia Induzida por Exercício Dependente de Alimentos
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i> - Células Apresentadoras de Antígeno
CXCR-3	Receptor de quimiocina CXC tipo 3
DC	Doença Celíaca
DCP	1,3-dicloro-2-propanol
DH	Degree of hydrolysis - Grau de hidrólise
E-64	Trans-epoxissuccinil-L-leucilamido (4-guanidino) butano
FODMAP	<i>Fermentable Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides e Polyols</i> - Oligossacarídeos, Dissacarídeos, Monossacarídeos e Polióis Fermentáveis
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> - Antígeno Leucocitário Humano
HMW-GS	<i>High Molecular Weight Glutenin Subunits</i> - Subunidade de Gliadina de Alto Peso Molecular
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LMW-GS	<i>Low Molecular Weight Glutenin Subunits</i> - Subunidade de Gliadina de Baixo Peso Molecular
MCPD	3-cloro-1,2-propanodiol
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> - Complexo Principal de Histocompatibilidade
NPE	Noni puree extract - Extrato do purê de noni
SGNC	Sensibilidade ao Glúten Não Celíaca
TCR	<i>T-cell Receptor</i> – Receptor de Células T
TG	Transglutaminase
TLR	<i>Toll-like receptors</i> – Receptores do tipo Toll

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Peptidases.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Glúten.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>Desordens relacionadas ao glúten.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4</b>	<b>Hidrólise enzimática do glúten.....</b>	<b>29</b>
<b>2.5</b>	<b><i>Morinda citrifolia</i> L.....</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE.....</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Objetivos gerais.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>ARTIGO DA TESE: CYSTEINE PEPTIDASES FROM NONI FRUITS (<i>Morinda citrifolia</i> L.) ARE PROMISSING IN THE HYDROLYSIS OF WHEAT GLUTEN AND SAFE AS A NEW FOOD INGREDIENTE.....</b>	<b>39</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As peptidases constituem um dos grupos mais importantes de enzimas com aplicações em processos industriais, perfazendo aproximadamente 60% do total de enzimas no mercado (GURUMALLESH *et al.*, 2019). São extensamente utilizadas como aditivos em detergentes, nas indústrias alimentícia, farmacêutica, têxtil e curtume, em virtude de suas especificidades na ação hidrolítica (LI *et al.*, 2013). Além da variedade de especificidades proteolíticas, essas enzimas são capazes de atuar em amplas faixas de pH e temperatura, expandindo seu potencial de uso na indústria (FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2011). Dentre as fontes de peptidases, as de origem vegetal têm alcançado grande espaço em indústrias farmacêuticas e biotecnológicas. Na indústria de alimentos, essas enzimas têm sido empregadas com a finalidade de alterar propriedades químicas, físicas, biológicas e imunológicas de proteínas. A hidrólise de proteínas alimentares permite melhorar as características nutricionais, retardar a deterioração, melhorar propriedades funcionais (solubilidade, formação de espuma, coagulação e emulsificação), sabores, aromas e texturas, produzir peptídeos bioativos e diminuir potenciais alergenicidades (PARDO; LAURA, 2000).

Dentre as proteínas alimentares que podem ter suas características melhoradas por meio da hidrólise enzimática está o glúten, uma matriz proteica formada principalmente pela gliadina e glutenina, duas proteínas presentes no trigo, uma das principais culturas produzidas no mundo, com cerca de 760,7 milhões de toneladas (cerca de 30% da produção total de grãos) (FAO, 2020). Essa grande demanda se deve ao valor nutricional do trigo e às propriedades viscoelásticas únicas das massas produzidas a base da farinha desse cereal, nas quais o glúten contribui para diferentes atributos técnicos e sensoriais dos produtos da indústria da panificação. Entretanto, o glúten possui epítomos imunogênicos que estimulam uma resposta imune em indivíduos geneticamente suscetíveis, desencadeando desordens como a doença celíaca, a sensibilidade ao glúten não celíaca e a alergia ao trigo, restringindo assim o seu consumo (CABANILLAS, 2019). O número de novos casos de paciente celíacos tem crescido substancialmente nos últimos 30 anos. Isso se deve em grande parte, ao desenvolvimento de técnicas para o diagnóstico. Estima-se que 1% da população mundial seja afetada pela doença celíaca e acredita-se que esse número possa ser ainda maior, visto que a incidência de DC ainda não tem sido amplamente estudada na África, Ásia e América Latina (KING *et al.*, 2020).

Uma dieta livre de glúten (DGF, dieta glúten-*free*) continua sendo o tratamento recomendado para doentes celíacos e pacientes sensíveis ou alérgicos ao glúten. Entretanto, a adesão a DGF muitas vezes é dificultada pela baixa disponibilidade de produtos glúten-*free*,

pelos preços mais elevados e características sensoriais menos atrativas quando comparados aos produtos correspondentes a base de trigo (SCHERF; WIESER; KOEHLER, 2018). Como forma de contornar esses problemas, estratégias para diminuição da imunogenicidade do glúten em alimentos têm sido empregadas. Dentre elas, a hidrólise enzimática tem recebido especial atenção. Contudo, o número de peptidases estudadas capazes de hidrolisar eficientemente epítomos do glúten ainda é pequeno, o que torna necessária a investigação de novas peptidases com essa finalidade (SCHERF; WIESER; KOEHLER, 2018).

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa identificaram peptidases cisteínicas no extrato aquoso do purê de noni (*Morinda citrifolia* L.), aqui denominado de NPE (do inglês, *noni puree extract*) com atividade coagulante de proteínas do leite e potencial para produção de queijos (FARIAS *et al.*, 2020). Diante disso, o presente trabalho buscou expandir a investigação acerca do potencial dessas enzimas no âmbito da indústria alimentícia, avaliando sua atividade proteolítica sobre as proteínas do glúten de trigo. A utilização de um novo ingrediente alimentar requer a comprovação de sua segurança de uso. Em muitos casos, isso é determinado por meio do conhecimento acerca do histórico de uso desse novo ingrediente na dieta humana (BLAAUBOER *et al.*, 2016). Desse modo, diante da ausência do histórico de consumo do noni no Brasil, estudos acerca da toxicidade de NPE são necessários, visando a sua aplicação futura na indústria de alimentos.

Com base no exposto, os seguintes questionamentos nortearam o presente estudo:

- Peptidases de NPE são capazes de hidrolisar o glúten do trigo com potencial para a produção de alimentos glúten-*free*? Esse efeito seria resultante da presença de diferentes frações proteásicas com especificidades distintas quanto à hidrólise do glúten?
- NPE apresenta algum efeito tóxico que inviabiliza sua utilização como ingrediente alimentar?



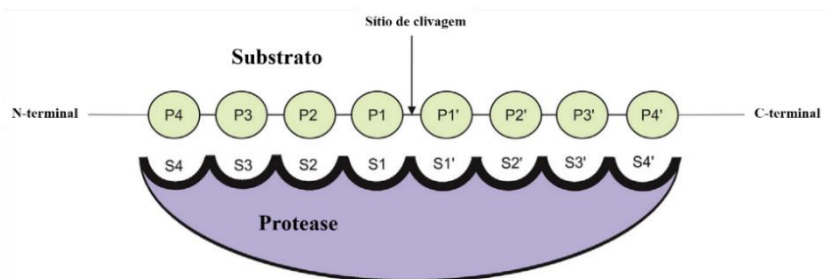
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Peptidases

As peptidases (EC 3.4), também conhecidas como peptidases ou enzimas proteolíticas, são enzimas capazes de clivar ligações peptídicas. Elas estão presentes em todos os organismos vivos e mostram especificidade e seletividade na modificação de proteínas, alcançada por meio de interações entre resíduos de aminoácidos no sítio ativo da enzima, com outros resíduos de aminoácidos adequadamente posicionados na proteína que será hidrolisada (Figura 1).

As enzimas proteolíticas são indispensáveis para a síntese de biomoléculas e para o controle do tamanho, forma, renovação e composição de proteínas celulares (GURUMALLESH *et al.*, 2019). Em humanos 2% do genoma codificam peptidases, gerando cerca de 500 enzimas diferentes. Em microrganismos patogênicos estima-se que esse percentual seja de 1-5% do genoma dessas espécies (FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2010). Normalmente, as peptidases são encontradas pró-enzimas ou precursores inativos, também chamados de zimogênios. Para serem ativadas, elas podem realizar clivagem autocatalítica ou serem clivadas por peptidases da mesma família ou de famílias completamente diferentes (YADAV *et al.*, 2011).

**Figura 1.** Nomenclatura da interação peptidase-substrato. Os locais de ligação do substrato a jusante do local de clivagem são numerados S1–Sn em direção ao N terminal do substrato e S1'–Sn' em direção ao C terminal. Os resíduos do substrato são numerados P1–Pn e P1'–Pn'. Nos dois casos, a numeração começa na ligação a ser clivada.

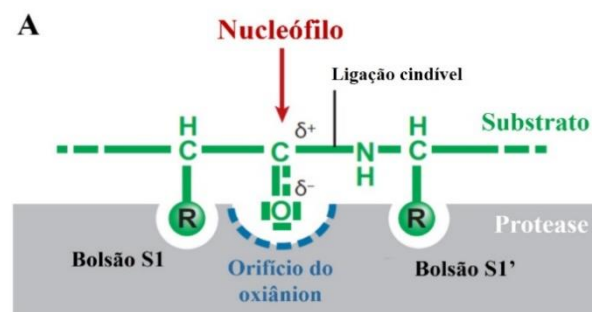


Fonte: Vizovišek *et al.* (2016)

De acordo com região da cadeia polipeptídica que clivam, as peptidases são classificadas em exopeptidases (EC 3.4.11-19) e endopeptidases (EC 3.4.21-99). Exopeptidases clivam proteínas-alvo nas extremidades da cadeia e são classificadas em aminopeptidases e

carboxipeptidases quando a hidrólise ocorre na porção amino- ou carboxi-terminal, respectivamente. As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica da proteína-alvo. Todas as peptidases polarizam o grupo carbonila da ligação peptídica do substrato, estabilizando o oxigênio em um bolsão oxianion, o que torna o átomo de carbono mais vulnerável ao ataque por um nucleófilo ativado (Figura 2A). As peptidases podem fazer isso de seis maneiras principais, o que leva a uma outra subdivisão, considerando o grupo reativo no sítio catalítico da enzima, nas seguintes classes: glutâmico-peptidases (EC 3.4.19); serino-peptidases (EC 3.4.21); cisteíno-peptidases (EC 3.4.22); aspártico-peptidases (EC 3.4.23); metalopeptidases (EC 3.4.24) e por fim, treonina-peptidases (EC 3.4.25) que apresentam um resíduo de treonina em seu sítio ativo (VERMELHO *et al.*, 2008).

**Figura 2.** Mecanismos de clivagem das classes catalíticas de peptidases. (A) O substrato (verde) se liga via resíduos de aminoácidos (R) ao sítio ativo da peptidase (cinza), interagindo com os bolsões de substrato (S) da enzima. O sítio de clivagem é adjacente a um grupo carbonila, que é polarizado pela enzima, estabilizando o bolsão oxianion (azul); isso torna o carbono da carbonila vulnerável a ataques nucleofílicos. (B) Principais diferenças entre as classes catalíticas quanto a natureza do nucleófilo e do estabilizador do oxianion.



**B**

Classe catalítica	Nucleófilo	Estabilizador de oxianion
Proteases cisteínicas	Cis-His	-NH-(2x)
Proteases serínicas	Ser-His	-NH-(2x)
Proteases treoninas	Tre-His	-NH-(2x)
Metaloproteases	H <sub>2</sub> O-Me <sup>2+</sup>	Me <sup>2+</sup>
Proteases aspárticas	H <sub>2</sub> O-Asp	H <sup>+</sup> -Asp
Proteases glutâmicas	H <sub>2</sub> O-Glu	H <sup>+</sup> -Glu

Fonte: van der Hoorn (2008).

As cisteíno, serino e treonina-peptidases utilizam um resíduo de Cys, Ser ou Ter, respectivamente, como nucleófilo, ativado pela histidina (His) no local ativo. O orifício de

oxiânion é geralmente estabilizado por dois resíduos da cadeia principal da peptidase. As metalopeptidases, peptidases aspárticas e glutâmicas utilizam a água como nucleófilo, ativadas por interações eletrostáticas com o íon metálico ( $\text{Me}^{2+}$ ), aspartato (Asp) ou glutamato (Glu), respectivamente. O oxiânion dessas peptidases é estabilizado por  $\text{Me}^{2+}$ , Asp e Glu, respectivamente (Figura 2B) (GURUMALLESH *et al.*, 2019; VAN DER HOORN, 2008).

A estrutura tridimensional de cisteíno peptidases, por exemplo, apresentam dois domínios: L (C-terminal) e R (N-terminal) e o sítio catalítico dessas peptidases encontra-se na reentrância formada entre os domínios. O resíduo de cisteína encontra-se no domínio L e o de histidina no domínio R (McGRATH, 1999). Em algumas famílias de cisteíno peptidases, um resíduo de glutamina e asparagina auxiliam na formação da cavidade do oxiânion. A glutamina estabiliza a estrutura tetraédrica intermediária durante a hidrólise do substrato e a histidina orienta o anel imidazólico (RAWLINGS, BARRET, 2000). O estado ionizado do resíduo de cisteína nucleofílico no sítio ativo é independente da ligação do substrato (POLGAR; HALASZ, 1982).

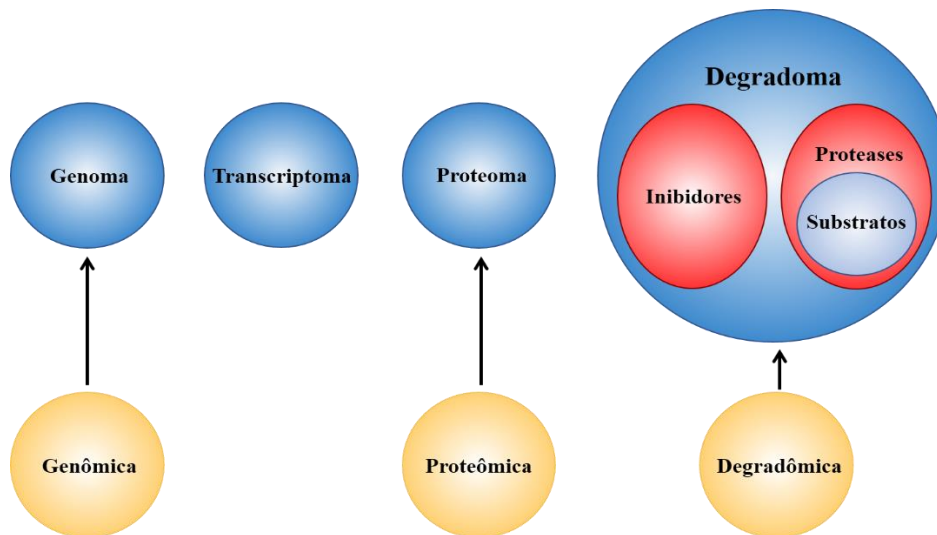
O mecanismo de ação das cisteínopeptidases usualmente ocorre em dois passos: acilação e desacilação. Primeiramente há o ataque nucleofílico do grupo tiol (Cys<sup>25</sup>-papaína) do sítio ativo ao carbono da carbonila do substrato. O íon imidazólico protona o nitrogênio da ligação peptídica. Com o rompimento dessa ligação peptídica, forma-se o intermediário acil-enzima e o primeiro produto é liberado (N-terminal). Em seguida, a His<sup>159</sup> desprotona uma molécula de água, que ataca o carbono da carbonila da cisteína ligada ao intermediário, resultando no produto C-terminal e na regeneração da enzima (desacilação) (RAO *et al.*, 1998).

As cisteíno-peptidases podem ser inibidas por agentes alquilantes do grupo tiol, como o iodoacetato e clorometilcetonas, por complexantes do grupo tiol, como compostos orgânicos e inorgânicos que contenham íons de metais pesados, e inibidores de natureza proteica (OTTO; SCHIRMEISTER, 1997). Dentre os inibidores de cisteíno-peptidases podemos citar o E-64, descoberto nos anos 70, que utiliza um grupo epoxisuccinil para interagir covalentemente com o enxofre reativo do sítio ativo (HANADA *et al.*, 1978).

Por apresentar a habilidade de catalisar irreversivelmente reações hidrolíticas, as peptidases devem ser rigorosamente reguladas quanto sua ativação e especificidade para evitar a ocorrência de distúrbios homeostáticos. Por sua vez, essa necessidade de especificidade levou à expansão evolutiva dos genes de peptidases para regular a proteólise correta de um grande conjunto de substratos, além da expansão paralela dos genes de inibidores de peptidases, elevando-se o nível de complexidade desse processo bioquímico (PÉREZ-SILVA *et al.*, 2016). Em reconhecimento a esse sistema complexo, o conceito de degradoma foi definido.

O degradoma corresponde ao conjunto completo de peptidases que são expressas em um momento específico por uma célula, tecido ou organismo, bem como o repertório de substrato de uma peptidase. Dá-se o nome de degradômica ao conjunto de investigações e técnicas genômicas e proteômicas relacionadas à identificação e caracterização genética, estrutural e funcional de peptidases, seus substratos e inibidores, presentes em um organismo (Figura 3) (LÓPEZ-OTÍN; OVERALL, 2002; SAVICKAS; KASTL; AUF DEM KELLER, 2020).

**Figura 3.** Relação da degradômica com os campos da proteômica e genômica e do degradoma com o proteoma e o genoma.



Fonte: López-Otín, Overall (2002).

Com base nas relações evolutivas, as peptidases foram categorizadas no banco de dados MEROPS (<http://www.ebi.ac.uk/merops/>), que atualmente conta com um total de 908.326 seqüências depositadas, distribuídas em 62 clãs e 268 famílias (RAWLINGS *et al.*, 2018). A base de dados MEROPS também apresenta informações sobre substratos e inibidores de peptidases. Outros websites dedicados às peptidases podem ser encontrados, como o Mammalian Degradome Database (<http://degradome.uniovi.es>), contendo resultados de anotações de genes de peptidases nos genomas de humanos, chimpanzés camundongos e ratos, e as relações entre alterações de peptidases e doenças hereditárias (degradomopatias) (PÉREZ-SILVA *et al.*, 2016); Proteolysis MAP (PMAP) (<http://www.hsls.pitt.edu/obrc/index.php?page=URL1233764714>), composto por cinco bancos de dados (PeptidaseDB, SubstrateDB, CutDB, ProfileDB e PathwayDB), abrangendo informações sobre eventos proteolíticos individuais (locais de clivagem) selecionados da

literatura (IGARASHI *et al.*, 2009) e Proteasix (<http://proteasix.org>), dedicada a identificação de peptidases presentes em humanos, ratos e camundongos envolvidas na hidrólise de proteínas, gerando peptídeos.

Nos vegetais as peptidases desempenham papéis cruciais em muitos processos fisiológicos, tais como a mobilização de proteínas de armazenamento, a morte celular programada, senescência, abscisão, o desenvolvimento e amadurecimento de frutos, crescimento da planta e em respostas de defesa contra patógenos e pragas (VAN DER HOORN; JONES, 2004; VAN DER HOORN, 2008; LIU *et al.*, 2018; TORNKVIST *et al.*, 2019). Além disso, elas também participam da renovação de proteínas pela degradação de proteínas mal dobradas e através do sistema ubiquitina-proteassoma (BEERS *et al.*, 2000) e são responsáveis pelas modificações pós-traducionais de proteínas por proteólise em locais altamente específicos (SCHALLER, 2004). A clivagem de proteínas, permitindo a reciclagem de nitrogênio e outros nutrientes, é provavelmente o processo mais importante de degradação que ocorre durante a senescência de plantas. Por esse motivo, diversos genes de peptidases são expressos durante esse processo (BHALERAO *et al.* 2003). Por exemplo, nas folhas de salsa (*Petroselinum crispum* Mill.), a atividade de uma serino-peptidase (70 kDa) aumenta com o avanço da senescência (JIANG *et al.* 1998).

Das funções realizadas pelas peptidases nas plantas, uma das mais estudadas e determinantes em que elas são protagonistas é a germinação através da hidrólise e mobilização de outras proteínas acumuladas em sementes e grãos de cereais (SZEWINSKA *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2018; RADCHUK *et al.*, 2018). Embora vários grupos de peptidases sejam identificadas como responsáveis por desempenhar esse papel, as mais representativas na mobilização e degradação de proteínas de armazenamento são as cisteíno-peptidases (MARTINEZ *et al.*, 2019).

A hidrólise de proteínas possui uma ampla variedade de aplicações em diversos processos biotecnológicos (Tabela 1), desde a proteólise limitada, na qual envolve uma alta especificidade e clivagem de um número limitado de ligações peptídicas, até a proteólise degradativa, na qual se busca uma hidrólise mais extensa de uma proteína alvo, incluindo a clivagem de ligações peptídicas múltiplas e a eventual degradação completa da proteína em aminoácidos (TAVANO, 2018).

Essas enzimas têm um importante potencial de aplicação na indústria farmacêutica para o tratamento de câncer (TARGONI *et al.*, 1999), doenças relacionadas à formação de coágulos sanguíneo (BALAMI *et al.*, 2013), para distúrbios da digestão (MELLO *et al.*, 2008) e modulação imunológica (OTSUKI *et al.*, 2010). Estão também inseridas na formulação de

meio de cultura (HEADON; WALSH, 1994), isolamento de material genético (GENELHU *et al.*, 1998) e na indústria de couro (FOROUGH; KESHAVARZ; EVANS, 2006). Além disso, elas são usadas na produção de aminoácidos essenciais (como a lisina) e para a prevenção do entupimento de sistemas de águas residuais (RAO *et al.*, 1998).

Na indústria de alimentos, as peptidases são utilizadas para fabricar queijos, cervejas, bebidas (preparação de hidrolisados proteicos com altos valores nutricionais) (GURUMALLESH *et al.*, 2019), amaciar carnes (ZHANG *et al.*, 2017), produzir emulsificantes, além de outros (PARDO *et al.*, 2000). A hidrólise de proteínas alimentares é realizada para melhorar as propriedades da matriz alimentar, alterando a qualidade sensorial (sabor, aroma e textura, por exemplo), nutricional, aumentando a digestibilidade, retardando a deterioração, melhorando propriedades funcionais (solubilidade, formação de espuma, coagulação e emulsificação), diminuindo a alergenicidade ou produzindo peptídeos bioativos (PARDO *et al.*, 2000).

Do ponto de vista mercadológico, as peptidases são as enzimas que possuem o maior destaque comercial devido às suas inúmeras aplicações nas indústrias de processamento de couro e lã, farmacêutica, de detergentes, alimentícia, dentre outras (TAVANO, 2018). São consideradas um dos tipos mais importantes de enzimas porque representam cerca de 60% de todas as enzimas comercializadas no mundo (GURUMALLESH *et al.*, 2019). O mercado global de peptidases deverá crescer de US \$ 2,12 bilhões em 2020 para US \$ 3,35 bilhões em 2028, a uma taxa de crescimento anual composta de 5,9 % durante o período de previsão 2021-2028 (FIOR MARKETS, 2021).

A maioria das enzimas comerciais é obtida de fontes microbianas, pois requerem baixos custos para produção em larga escala (GURUMALLESH *et al.*, 2019), mas as enzimas de plantas estão se tornando cada vez mais importantes. As preparações enzimáticas obtidas a partir de extratos vegetais são utilizadas em processos industriais há muito tempo, mesmo antes de se conhecer acerca da natureza e propriedades das enzimas. No setor industrial, as peptidases vegetais são muito atraentes porque podem atuar em uma ampla faixa de temperatura e pH (DUBEY *et al.* 2007) e as mais utilizadas são papaína, bromelaína e ficina, extraídas de *Carica papaya*, *Ananas comosus* e *Ficus carica*, respectivamente. Entretanto, peptidases com novas propriedades físico-químicas e mais interessantes para a indústria ainda estão sendo descobertas (FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2010).

## 2.2 Glúten

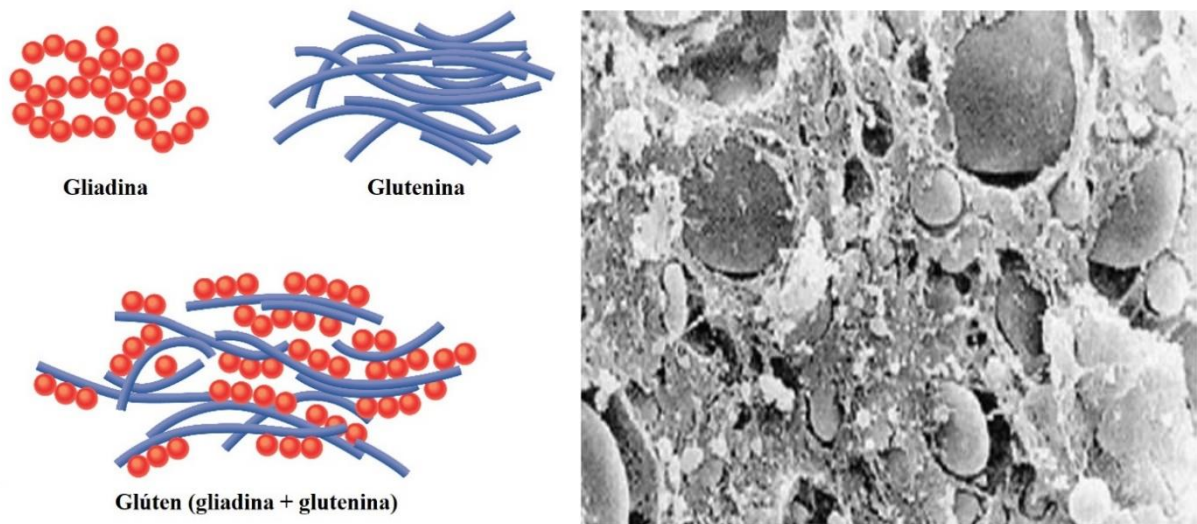
Glúten é um termo designado a um conjunto de proteínas de armazenamento em sementes, solúveis em álcool que podem ser encontradas no trigo (*Triticum aestivum*, gliadinas e gluteninas), cevada (*Hordeum vulgare*, hordeínas), centeio (*Secale cereale*, secalinas) e algumas variedades de aveia (*Avena* sp., aveninas), espécies pertencentes à família Poaceae. Proteínas do glúten de trigo são encontradas no endosperma do grão maduro, onde formam uma matriz contínua em torno dos grânulos de amido e representam até 80% do total de proteínas desses grãos (ROSELL *et al.*, 2014). São caracterizadas pelo grande conteúdo de glutamina (35%), aminoácidos hidrofóbicos (19%) e prolina (15%) e pelo baixo conteúdo de aminoácidos com cadeias laterais carregadas, o que lhes confere baixa solubilidade em água. Além disso, possuem poucos resíduos de cisteína (~ 2%) que são suficientes para a estrutura e função das proteínas do glúten.

Gliadinas são polipeptídeos de cadeia única e podem ser agrupadas em quatro tipos diferentes, com base na sequência e composição de aminoácidos e massas moleculares, a saber:  $\omega$ 5- (~ 50 kDa),  $\omega$ 1,2- (~ 40 kDa),  $\alpha/\beta$ - e  $\gamma$ -gliadinas (~ 28-35 kDa), sendo as duas últimas encontradas em maior proporção. As gluteninas compreendem proteínas agregadas ligadas através de pontes dissulfeto com massa molecular variando de 500 a mais de 10.000 kDa. São divididas em subunidades de glutenina de baixo peso molecular (LMW-GS, *low molecular weight glutenin subunits* – 32-39 kDa) e subunidades de glutenina de alto peso molecular (HMW-GS, *high molecular weight glutenin subunits* – 67-88 kDa). Após a redução das ligações dissulfeto, as subunidades de glutenina resultantes mostram uma solubilidade em soluções alcólicas semelhante às gliadinas.

Gliadinas e gluteninas são caracterizadas por um alto polimorfismo genético e sua distribuição total entre os diferentes tipos é fortemente dependente da variedade do trigo e das condições de cultivo (solo, clima, fertilização) (WIESER, 2007). Essas proteínas são de grande importância para a indústria da panificação pelo seu desempenho único na formação de uma rede polimérica viscoelástica em produtos à base de farinha de trigo, conferindo capacidade de absorção de água, coesividade, viscosidade e elasticidade. As gliadinas hidratadas têm pouca elasticidade e são menos coesivas do que as gluteninas e contribuem principalmente para a viscosidade e extensibilidade da massa. Em contraste, as gluteninas hidratadas são coesivas e elásticas e são responsáveis pela força e elasticidade da massa (WIESER, 2007) e quando presentes na proporção ideal de 2:1 (gliadina/glutenina) conferem excelente propriedade de retenção de gás e formação de poros uniformes após o cozimento (SCHERF, 2019). Após o

contato com a água e o intenso trabalho mecânico há a interação de gliadinas e gluteninas (Figura 4) através de pontes dissulfeto intra e intercadeia e ligações cruzadas covalentes de tirosina-tirosina entre as proteínas do glúten e as ligações cruzadas de tirosina-ácido desidroferúlico entre as proteínas do glúten e o arabinosilano. A estrutura covalente da rede do glúten é sobreposta por ligações não-covalentes como pontes de hidrogênio, ligações iônicas e ligações hidrofóbicas (WIESER, 2007).

**Figura 4.** Representação das proteínas do glúten. À esquerda, desenhos representativos que mostram as classes de proteínas do glúten e a interação entre elas. À direita, uma micrografia eletrônica de varredura mostra a matriz do glúten.



Fonte: Fasano, 2011.

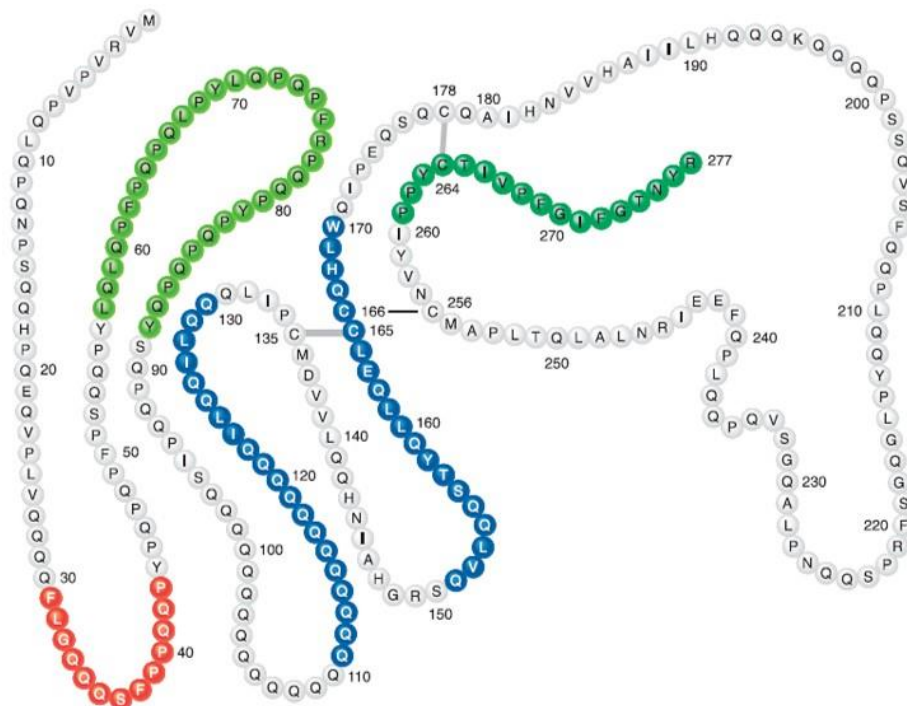
O glúten possui sequências repetitivas ricas em glutamina e prolina. Esse último, tem uma estrutura cíclica de tetra-hidropirrol envolvendo o grupo  $\alpha$ -amino. Essa estrutura impede a rotação em torno da ligação  $\alpha$ C – N da cadeia polipeptídica, ao fixar o ângulo amino diédrico em cerca de  $-65^\circ$ , impedindo que as sequências contendo prolina se liguem ao sítio ativo de enzimas digestivas (JAYAWARDANA *et al.*, 2021). Tal evento resulta em uma digestão incompleta do glúten pelas enzimas gastrointestinais humanas, tais como a pepsina, tripsina e quimotripsina, gerando peptídeos capazes de atravessar a barreira epitelial intestinal, iniciando cascatas imunogênicas envolvidas nas respostas alérgicas, sensibilidade ao glúten não-celíaca e na doença celíaca (SCHERF, 2019).

Existem pelo menos 50 epítomos em peptídeos oriundos do glúten que exercem atividades citotóxicas, imunomoduladoras e permeadoras do intestino. Essas atividades foram parcialmente mapeadas para domínios específicos em  $\alpha$ -gliadina (Figura 5): o peptídeo



citotóxico 31-43, o peptídeo imunomodulador 57-89 (33-mer), os peptídeos de liberação de zonulina de ligação de CXCR3 (permeadores intestinais) 111-130 e 151-170 e o peptídeo liberador de interleucina (IL)-8 261-277 (FASANO, 2011). O peptídeo 33-mer da  $\alpha$ 2-gliadina (sequência aminoacídica: LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF) continua a ser o mais importante em estudos de doença celíaca, por possuir três epítomos de células T sobrepostos: PQPQLPYPQ (repetido 3 vezes), PYPQPQLPY (repetido 2 vezes) e PFPQPQLPY. É frequentemente descrito como imunodominante e por esse motivo, amplamente utilizado como peptídeo modelo em vários sistemas de teste e para estudar a capacidade de degradação de glúten de novas fontes promissoras de peptidases (SCHERF; WIESER; KOEHLER, 2018).

**Figura 5.** Mapeamento de motivos de  $\alpha$ -gliadina. Aqueles que exercem atividade citotóxica são mostrados em vermelho, atividade imunomoduladora em verde-claro, liberação de zonulina e atividade de permeação intestinal em azul e liberação de IL-8 dependente de CXCR3 em pacientes com DC em verde escuro.



Fonte: Fasano, 2011.

Nas últimas décadas, o glúten tem atraído grande atenção devido ao crescente número de casos relacionados aos efeitos adversos decorrentes da ampla exposição a essa rede

de proteínas. Tais efeitos adversos são denominados doenças relacionadas ao glúten, que são mediadas pelo sistema imune. São elas: doença celíaca, alergia ao trigo e sensibilidade ao glúten não-celíaca.

Tem sido também observada uma tendência crescente de adoção de uma dieta livre de glúten na população, chegando a 7% em alguns países (CABANILLAS, 2019), mesmo na ausência de distúrbios relacionados ao glúten e sem orientação profissional, baseada no raciocínio de que a retirada do glúten da dieta é uma opção mais saudável, que pode trazer benefícios como perda de peso, melhoria da digestibilidade, clareamento da pele, dentre outros. Entretanto, não há evidências científicas que garantam benefícios de uma dieta livre de glúten a indivíduos saudáveis (ARSLAIN *et al.*, 2021). Pelo contrário, muitos alimentos isentos de glúten são produzidos a partir da farinha de outros cereais, principalmente de arroz, e quando comparados aos produtos convencionais a base de trigo apresentam comumente mais calorias, gordura e sódio, ao passo que contêm menores quantidades de vitamina B-12, folato, niacina, vitamina D, ferro, zinco, magnésio, cálcio, fibras dietéticas e proteínas (ARSLAIN *et al.*, 2021). Segundo Hager *et al.* (2012) a farinha teff (*Eragrostis tef*) e de quinoa (*Chenopodium quinoa*) poderiam ser candidatos promissores em substituição ao trigo por apresentarem alto valor nutricional, contudo, possuem altos níveis de ácido fítico, considerado um fator antinutricional, além de apresentam preços elevados.

### **2.3 Desordens relacionadas ao glúten**

A doença celíaca (DC) é uma enteropatia crônica intestinal imunomediada pela exposição ao glúten em indivíduos geneticamente predispostos. O início dos sintomas é geralmente gradual e caracterizado por um intervalo de meses ou anos após a introdução do glúten na dieta. No entanto, em pacientes em tratamento prolongado com dieta livre de glúten, a ingestão dessa proteína pode ocasionalmente causar sintomas imediatos, como vômitos e dor abdominal (SAPONE *et al.*, 2012). Estima-se que 1% da população mundial apresente essa doença e um motivo proposto para essa tendência é que, com um mercado mundial globalizado, os países em desenvolvimento que tradicionalmente dependiam de grãos isentos de glúten, como arroz e milho, estão incorporando cada vez mais alimentos à base de trigo em suas dietas (GREEN; LEBWOHL; GREYWOODE, 2015). Há evidências de que o diagnóstico para DC é muitas vezes ignorado em crianças nas quais a infecção e a desnutrição são comumente associadas à doença diarreica (BYASS; KAHN; IVARSSON, 2011; RAVIKUMARA; NOOTIGATTU; SANDHU, 2007).

No intestino saudável há vilosidades longas e criptas proliferativas curtas, ao passo que o intestino celíaco apresenta atrofia das vilosidades e alargamento das criptas. Isso leva à redução da superfície de absorção de nutrientes (STAMNAES; SOLLID, 2015) e resulta em um quadro de diarreia, esteatorreia, perda de peso e restrição do crescimento em crianças, dor abdominal e constipação (LUDVIGSSON *et al.*, 2012). Alguns pacientes podem apresentar sintomas gastrointestinais mínimos ou nenhum, mas apresentar sintomas extra intestinais como anemia ferropriva, dermatite herpetiforme, ataxia cerebelar, linfoma, artrite e doença óssea metabólica (SHANNAHAN; LEFFLER, 2017).

A manifestação de DC é dependente da interação de três fatores: genética, exposição ao glúten e influências ambientais. O fator genético mais importante é o MHC de classe II (do inglês *major histocompatibility complex*). A maioria dos pacientes DC expressa o heterodímero HDL-DQ2.5 (alelos *DQA1\*05*, *DQA1\*02*) (~90%), enquanto uma outra parcela expressa HLA-DQ2.2 (alelos *DQA1\*02:01*, *DQB1\*02:02*) ou HLA-DQ8 (alelos *DQA1\*03*, *DQB1\*03:02*) (~5% cada) (STAMNAES; SOLLID, 2015). Embora esses alótipos HLA (do inglês *human leukocyte antigen*) sejam necessários para o desenvolvimento da doença, a sua presença não é determinante para o diagnóstico, uma vez que 30% a 40% da população geral são portadores de pelo menos um desses alelos. Todavia, a sua ausência indica resultado negativo para DC (GREEN; LEBWOHL; GREYWOODE, 2015).

Sob condições fisiológicas normais, as junções intercelulares do epitélio intestinal funcionam como a principal barreira à passagem de macromoléculas, tais como as proteínas do glúten. Contudo, acredita-se que os peptídeos oriundos da digestão incompleta do glúten alcancem a lâmina própria do intestino por duas vias: transcitose epitelial mediada pelo interferon  $\gamma$  (INF $\gamma$ ) (SCHUMANN *et al.*, 2008) e via paracelular através das junções intercelulares (SCHUPPAN; JUNKER; BARISANI, 2009). Quando esse sistema de junção intercelular está comprometido em decorrência de infecção entérica, cirurgia ou DC, ou como resultado da regulação positiva da zonulina, peptídeos grandes podem assim atravessar a barreira epitelial e alcançar as células apresentadoras de antígenos (do inglês APC, *antigen-presenting cells*) na lâmina própria (NIEWINSKI, 2008).

A base estrutural para a relação HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 e HLA-DQ8 (MHC classe II), encontrados na superfície celular de APCs de pacientes com doença celíaca está na preferência desses alótipos por ligações peptídicas com aminoácidos carregados negativamente. Os peptídeos do glúten de trigo têm poucos resíduos carregados e os resíduos de prolina impedem a formação eficiente de pontes de hidrogênio entre MHC de classe II. Dessa forma esses peptídeos, ao alcançarem a lâmina própria do epitélio intestinal, tornam-se substrato da

enzima transglutaminases 2 (TG2), que converte glutamina em ácido glutâmico. A introdução de cargas negativas por desaminação ocorre de uma maneira altamente dependente da sequência e isso é guiado pelo posicionamento dos resíduos de prolina. Essa desaminação de peptídeos do glúten gera resíduos de glutamato que funcionam como âncora e levam à formação de um complexo estável com HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 e HLA-DQ8 (STAMNAES; SOLLID, 2015).

Após a interação com alótipos do HLA, os peptídeos desaminados do glúten são apresentados às células T CD4<sup>+</sup>, levando à sua ativação, ocasionando a inflamação intestinal e, em última instância, hiperplasia das criptas e atrofia das vilosidades intestinais (CRESPO PÉREZ *et al.*, 2012). Além disso, esses linfócitos podem estimular a produção de anticorpos tanto contra epítomos do glúten como contra o autoantígeno TG2 (DU PRÉ, 2015).

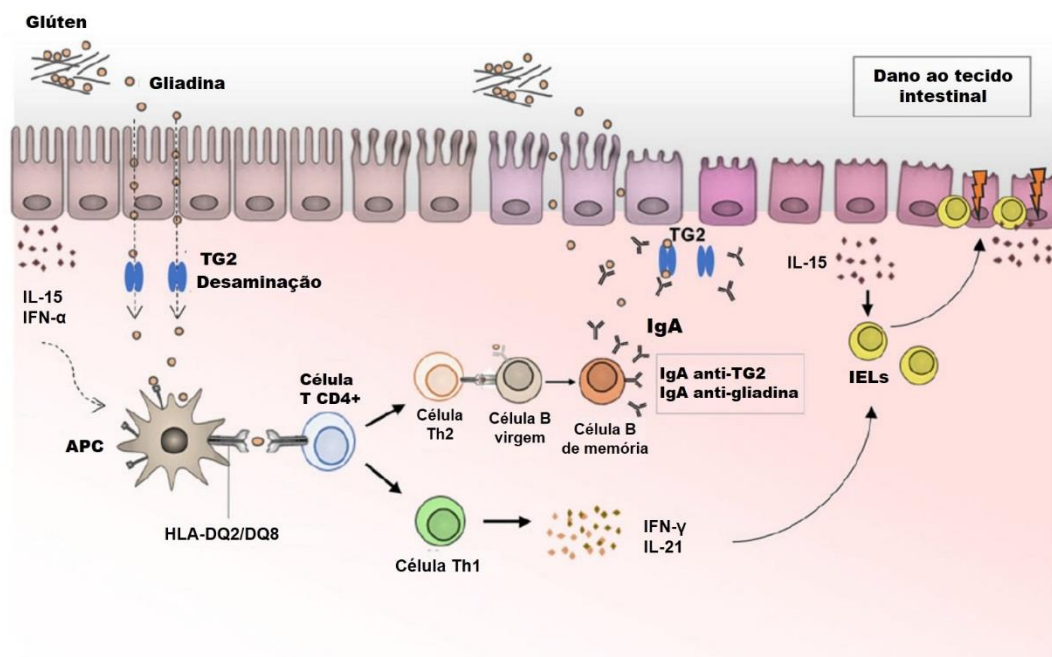
Vários fatores podem aumentar o risco de DC, como o uso de antibióticos e de inibidores da H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (LEBWOHL; LUDVIGSSON; GREEN, 2014). Outro fator possivelmente associado é a influência patogênica da proporção de certas bactérias presentes na microbiota intestinal (OLIVARES *et al.*, 2014). Além disso, análises sobre a influência do reovírus, conhecido como um patógeno avirulento que provoca imunidade protetora, no desenvolvimento de DC, propuseram que vírus podem induzir respostas imunitárias pró-inflamatórias ao antígeno dietético alterando a homeostase imune intestinal, inclusive em locais onde a tolerância oral é induzida (BOUZIAT *et al.*, 2017).

A alergia ao trigo também é uma desordem que produz uma resposta imune, com prevalência de 0,33% a 1,17%, mas diferentemente do que ocorre na DC, a resposta nesse caso é mediada por anticorpos IgE induzidos por proteínas contidas no trigo e não necessariamente em outros grãos, como centeio ou cevada. Atualmente, há 28 alérgenos no trigo descritos pelo Allergen Nomenclature Sub-Committee IUIS (<http://www.allergen.org>, acesso em set. 2021) dentre eles  $\omega$ ,  $\alpha/\beta$ - e  $\gamma$ -gliadinas, glutenina de alto e baixo peso molecular, inibidor de  $\alpha$ -amilase/tripsina, proteína transferidora de lipídeos, dentre outros.

A alergia ao trigo associada à ingestão tem uma prevalência maior em crianças e pode produzir sintomas como vômitos, dor abdominal, angioedema, urticária, anafilaxia, dentre outros. Em adultos essa alergia por ingestão frequentemente é associada a reações anafiláticas associadas ao exercício. Essa condição recebe o nome de anafilaxia induzida por exercício dependente de alimentos (AIEDA), que além do trigo está associada também à ingestão de frutos do mar, leite de vaca, aipo, milho, banana, farinhas contaminadas com ácaros e amendoim (GELLER, 2015). A farinha de trigo crua também pode induzir alergia por inalação, sendo denominada asma do padeiro e trata-se de umas das alergias ocupacionais mais frequentes em vários países (QUIRCE; DIAZ-PERALES, 2013). Nessa condição, a rinite

frequentemente precede os sintomas asmáticos, além disso, conjuntivite também pode estar associada. O diagnóstico envolve teste por picada na pele (*skin-prick test* - SPT) e testes para a detecção e quantificação de IgE específica para extrato de trigo e alérgenos de trigo no soro sanguíneo.

**Figura 6.** Aspectos da fisiopatologia da doença celíaca. HLA-DQ2/DQ8 em células apresentadoras de antígeno (APC) apresenta peptídeos derivados do glúten desaminados por TG2 em células T CD4+, que são fundamentais para o início da resposta inflamatória na DC. Por um lado, eles promovem uma resposta em Th1 no qual grandes quantidades de IFN- $\gamma$  e IL-21 são produzidas contribuindo para a ativação de linfócitos intraepiteliais, que são fundamentais para o dano ao tecido intestinal. Outras citocinas, como IL-15 ou IFNs tipo I, são reguladas positivamente no epitélio da lâmina própria na doença celíaca e são essenciais na função e expansão dos linfócitos intraepiteliais. As células T CD4+ também induzem uma resposta em Th2 e promovem a expansão clonal das células B e a produção de anticorpos IgA contra TG2 e gliadina.



Fonte: Cabanillas (2019).

O termo sensibilidade ao glúten não-celíaca (SGNC) foi designado às pessoas que relataram sintomas relacionados à ingestão de glúten e responderam satisfatoriamente frente a uma dieta livre de glúten. Essa doença apresenta diferenças em relação às outras desordens mencionadas anteriormente por não haver a produção de autoanticorpos IgA anti-TG2 ou IgE

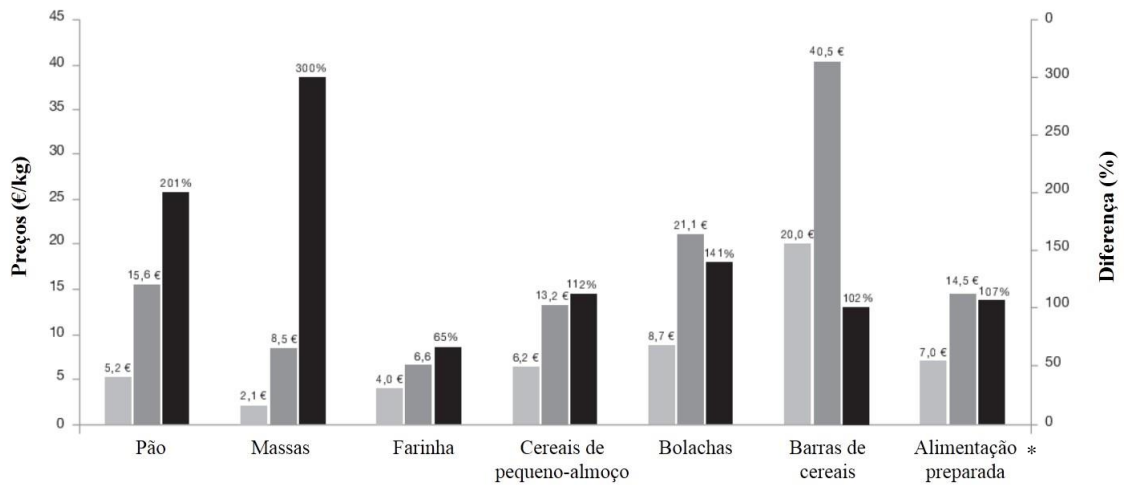
específica contra proteínas do trigo. Além disso, os pacientes apresentam permeabilidade intestinal normal. Como ainda não há biomarcadores específicos disponíveis, o diagnóstico de SGNC é realizado por meio do critério de exclusão entre DC e alergia ao trigo e sua prevalência varia amplamente entre os estudos, oscilando entre 0,16% a 13% (CABANILLAS, 2019). Apesar disso, um estudo recente sugeriu que certos marcadores de inflamação, como um aumento na infiltração de eosinófilos na mucosa retal, possam constituir um possível biomarcador específico da SGNC (CARROCCIO *et al.*, 2019).

Atualmente, o tratamento mais difundido para pacientes acometidos com essas desordens ainda é uma dieta livre de glúten durante toda a vida (ARSLAIN *et al.*, 2021). Enquanto a maioria das pessoas adquire tolerância ao consumo de glúten, outras são sensíveis, resultando em alergia mediada por IgE ou na própria doença celíaca. Para garantir a segurança dos consumidores sensíveis ao glúten, o *Codex Alimentarius* (CODEX STANDARD 118-1979, 2015), especifica o limite máximo de 20 mg/kg de glúten em alimentos rotulados com a especificação “não contém glúten” em dois grupos diferentes de alimentos e bebidas, aqueles produzidos a partir de cereais que não contém glúten e aqueles produzidos a partir de cereais que possuem glúten, mas que são processados a fim de obter um conteúdo final de glúten abaixo de 20 mg/kg (WATSON *et al.*, 2021).

A maioria dos alimentos livres de glúten disponíveis no mercado atualmente são produzidos a partir de outros cereais naturalmente sem glúten, que frequentemente são inferiores aos produtos correspondentes a base de trigo em relação ao sabor, cor, textura e sensação na boca. Essas propriedades aliadas a disponibilidade limitada no mercado de produtos glúten-*free* e aos custos elevados podem contribuir para uma menor adesão à dieta livre de glúten, que é estimada em apenas 45-80% em pacientes adultos com DC (SCHERF; WIESER; KOEHLER, 2018). Embora o custo de produtos livres de glúten tenha diminuído nos últimos 10 anos, permanece significativamente mais alto do que os produtos equivalentes à base de trigo, podendo atingir uma diferença de até 300% para alguns alimentos (Figura 7) (LEE *et al.*, 2019; AFONSO; JORGE; MOREIRA, 2016).

Aderir a uma dieta sem glúten para toda a vida pode ter um impacto negativo significativo na qualidade de vida e pode produzir um estresse psicológico, emocional e econômico considerável nos pacientes. Além disso, o glúten pode estar presente em alimentos sem amido, como molho de soja e cerveja, o que torna tal tarefa ainda mais difícil (CAPUTO *et al.*, 2010).

**Figura 7.** Preços médios por categoria de produtos alimentares e percentagem de diferença de preço.



\* Base de pizza, empanados de peixe, lasanha e pizza congelada.

Fonte: Afonso, Jorge, Moreira (2016).

Várias estratégias têm sido desenvolvidas com o objetivo de reduzir o potencial imunogênico das proteínas do glúten como a modificação genética de linhagens de trigo para a obtenção de baixo teor de gliadina através da tecnologia de RNAi (GIL-HUMANES *et al.*, 2010) e CRISPR/Cas9 (SÁNCHEZ-LEÓN *et al.*, 2018), vacina, modulação da permeabilidade intestinal, polímeros sequestrantes de gliadinas e proteólise de peptídeos imunodominantes antes da ingestão ou em co-administração com alimentos (RIBEIRO *et al.*, 2018). Contudo, a maioria ainda encontra muitas dificuldades na fase de estudo.

## 2.4 Hidrólise enzimática do glúten

O glúten pode ser hidrolisado quimicamente ou por meio de enzimas. A hidrólise ácida é conduzida mais facilmente e por esse motivo é o método mais comumente utilizado para hidrolisar o glúten na indústria. No entanto, a hidrólise ácida pode levar a reações secundárias indesejadas, além de resultar muitas vezes na degradação de aminoácidos essenciais. A hidrólise tradicional com ácido clorídrico pode formar substâncias consideradas tóxicas, tais como 3-cloro-1,2-propanodiol (MCPD) e 1,3-dicloro-2-propanol (DCP) e resultar em concentrações elevadas de cloreto de sódio nos produtos neutralizados (GIESLER *et al.*, 2013).

Por outro lado, a hidrólise enzimática apresenta diversas vantagens em relação a hidrólise química. É um processo limpo e específico, requer baixo consumo de energia e condições de trabalho mais seguras com toxicidade reduzida, baixa produção de resíduos e não influenciam no valor nutritivo do glúten do trigo. Além disso, enzimas são biodegradáveis, normalmente desnaturadas durante o cozimento, e são aditivos mais preferíveis comparados aos agentes químicos (POURMOHAMMADI; ABEDI, 2021). O estudo da ação de peptidases sobre o glúten se baseia em três motivos principais: melhorar suas propriedades físico-químicas do glúten, pesquisar peptídeos com atividade biológica obtidos a partir da hidrólise, e obter informações acerca de sua estrutura do glúten (KONG; ZHOU; QIAN, 2007).

Enzimas capazes de degradar o glúten foram identificadas em plantas, especialmente em cereais contendo glúten (*Triticum* sp., *Secale cereale*, *Hordeum vulgare*), nomamão (*Carica papaya*), em fungos como *Aspergillus flavus* var. *oryzae* e *A. niger*, bactérias incluindo *Sphingomonas capsulata*, *Myxococcus xanthus*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Rothia mucilaginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp., e em insetos como a broca-pequena *Rhizopertha dominica* (SCHERF; WIESER; KOEHLER, 2018).

Para desencadear uma resposta imune em doentes celíacos os peptídeos de glúten com um tamanho  $\geq 9$  resíduos de aminoácidos precisam atravessar o trato gastrointestinal e atingir a lâmina própria para conseguirem se ligar ao bolsão de ligação de HLA-DQ2/8. Consequentemente, qualquer peptidase capaz de hidrolisar o glúten em peptídeos com menos de nove resíduos de aminoácidos, poderia eliminar efetivamente a imunorreatividade observada na fisiopatologia da doença celíaca (SCHERF; WIESER; KOEHLER, 2018). Uma alternativa considerada para avaliar a eficiência de peptidases é a sua capacidade em clivar o peptídeo 33-mer da  $\alpha$ -gliadina.

Até o momento poucas enzimas se mostraram potencialmente adequadas para a degradação das proteínas do glúten no processamento de alimentos (Figura 8). Como esperado, peptidases de grãos que contém glúten, como cevada e trigo, foram capazes de clivar o peptídeo 33-mer em diversos sítios, visto que essas peptidases, em sua maioria cisteínicas, atuam na mobilização das proteínas de reserva durante a germinação. Entretanto, a atividade proteolítica dessas peptidases é perdida na presença de etanol ( $\geq 2\%$ ), o que pode limitar sua utilização em alguns processos industriais (KNORR *et al.*, 2016).

A enzima caricaína, obtida a partir do látex de *Carica papaya*, foi capaz de reduzir o conteúdo de gliadina em pães integrais (BUDDRICK; CORNELL; SMALL, 2015) e atualmente é comercializado como suplemento alimentar para auxiliar na digestão de proteínas



do glúten (GluteGuard®). A actinidina, enzima extraída dos frutos de kiwi, também se mostrou promissora na hidrólise de diferentes sítios em gliadinas, bem como do peptídeo 33-mer (JAYAWARDANA *et al.*, 2021).

**Figura 8.** Visão geral dos locais de clivagem enzimática do peptídeo 33-mer de  $\alpha$ 2-gliadina. As setas indicam os sítios onde ocorrem as clivagens. X indica imunorreatividade persistente na doença celíaca;  $\checkmark$  indica completa hidrólise de seqüências de aminoácidos ativas na doença celíaca.

A	Pepsina	L <sup>†</sup> QLQPFPPQQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF	✗
B	Tripsina	LQLQPFPPQQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF	✗
C	Quimotripsina	LQLQPFPPQQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF	✗
D	Extrato de malte de cevada	LQ <sup>†</sup> LQP <sup>†</sup> FPQPQLP <sup>†</sup> YPQPQLP <sup>†</sup> YPQPQLP <sup>†</sup> YPQPQPF	✓
E	EP-B2 ( <i>Hordeum vulgare</i> )	LQ <sup>†</sup> LQPFPPQQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF	✓
F	Triticaina- $\alpha$ ( <i>Triticum aestivum</i> )	LQL <sup>†</sup> Q <sup>†</sup> PFPPQQLP <sup>†</sup> YPQPQLP <sup>†</sup> YPQPQLP <sup>†</sup> YPQPQLP <sup>†</sup> YPQPQPF	✓
G	Dipeptidil peptidase IV ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	LQLQPFPPQQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF	✗
H	Aspergillopepsina ( <i>A. niger</i> )	LQLQPFPPQQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF	✗
I	AN-PEP ( <i>Aspergillus niger</i> )	LQLQP <sup>†</sup> FP <sup>†</sup> QPQLP <sup>†</sup> YP <sup>†</sup> QPQLP <sup>†</sup> YP <sup>†</sup> QPQLP <sup>†</sup> YP <sup>†</sup> QPQPF	✓
J	SC-PEP ( <i>Sphingomonas capsulate</i> )	LQLQPFPPQQLP <sup>†</sup> YP <sup>†</sup> QPQLP <sup>†</sup> YP <sup>†</sup> QPQLP <sup>†</sup> YP <sup>†</sup> QPQPF	✓
K	MX-PEP ( <i>Myxococcus xanthus</i> )	LQLQP <sup>†</sup> FPQP <sup>†</sup> QLP <sup>†</sup> YPQPQLP <sup>†</sup> YPQPQLP <sup>†</sup> YPQPQPF	✓
L	FM-PEP ( <i>Flavobacterium meningosepticum</i> )	LQLQP <sup>†</sup> FPQPQLP <sup>†</sup> YP <sup>†</sup> QPQLP <sup>†</sup> YP <sup>†</sup> QPQLP <sup>†</sup> YP <sup>†</sup> QPQPF	✓
M	<i>Rothia mucilaginosa</i>	LQLQPF <sup>†</sup> P <sup>†</sup> QPQ <sup>†</sup> LPY <sup>†</sup> PQPQ <sup>†</sup> LPY <sup>†</sup> PQPQ <sup>†</sup> LPY <sup>†</sup> PQ <sup>†</sup> PQ <sup>†</sup> PF	✓
N	Pseudolisina ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	LQ <sup>†</sup> LQPFPPQQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF	✓
O	LAB PepN + PepX + PepO ( <i>Lactobacillus</i> sp.)	LQ <sup>†</sup> L <sup>†</sup> QP <sup>†</sup> FP <sup>†</sup> QPQLP <sup>†</sup> YP <sup>†</sup> QPQLP <sup>†</sup> LP <sup>†</sup> YP <sup>†</sup> QPQLP <sup>†</sup> LP <sup>†</sup> YP <sup>†</sup> QP <sup>†</sup> QPF	✓
P	<i>Rhizopertha dominica</i>	LQLQPFPPQPQLP <sup>†</sup> YP <sup>†</sup> QPQLP <sup>†</sup> YP <sup>†</sup> QPQLP <sup>†</sup> YPQPQPF	✓
Q	Kuma030	LQLQPFPPQQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF	✓

Fonte: Scherf; Wieser; Koehler (2018).

O uso de peptidases na diminuição da imunorreatividade do glúten se dá através do processamento de alimentos para fabricação de produtos glúten-free ou da ingestão como suplemento alimentar para auxiliar na digestão. Considerando essa última categoria, há disponíveis comercialmente diversas formulações destinadas a essa finalidade, como Digest Gluten® (peptidases de *A. oryzae*, *A. niger* e *A. melleus*), Glutalytic® (mistura de endopeptidases e exopeptidases, dentre elas dipeptidilpeptidase IV), GlutnGo® (prolyl endoprotease de *A. niger* conhecida comercialmente como Tolerase® G).

Muitos alimentos contêm glúten, embora não possuam quaisquer ingredientes que contenham glúten, devido ao contato cruzado com esses ingredientes (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2013) e frequentemente tem sido relatado casos de ingestão acidental.

Diante disso, tem sido proposto também o emprego de peptidases em formulações para limpeza de resíduos de glúten em processos industriais (FUCIÑOS *et al.*, 2019). A formulação enzimática Tolerase® G, por exemplo, é empregada para inativar contaminações ocultas de glúten que podem estar presentes em alimentos supostamente sem glúten.

Além de diminuir a imunogenicidade, a hidrólise enzimática das proteínas do glúten está se tornando cada vez mais importante nas indústrias alimentícias e não alimentícias com o objetivo de melhorar certas propriedades. O uso de peptidases é um eficiente método de modificação de proteínas, com as quais, sob condições de reação controladas, é possível obter hidrolisados com características diferentes da proteína de origem (ELMALIMADI *et al.*, 2017). A hidrólise enzimática limitada tem se mostrado mais eficiente para a melhoria das propriedades de solubilidade, emulsificação e formação de espuma. Já uma hidrólise mais profunda, que pode ser alcançada com o uso de um complexo de exo- e endopeptidases, pode gerar peptídeos mais curtos que podem apresentar atividade antioxidante, inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA), hepatoprotetora, dentre outras (ASRARKULOVA; BULUSHOVA, 2018).

## **2.5 *Morinda citrifolia* L.**

*Morinda citrifolia* L. é uma espécie pertencente à família Rubiaceae, nativa do sudeste da Ásia (Indonésia) à Austrália e globalmente conhecida como noni, nuna, mengkudu, nhaut, arbusto analgésico ou fruta queijo. Possui ciclo de vida perene, de clima tropical e temperado, geralmente encontrada em altitudes a partir a 400 m do nível do mar, embora se adapte melhor às regiões costeiras. Adaptada aos mais variados ambientes, essa espécie se desenvolve tanto em solos férteis como inférteis, secos ou úmidos, ácidos ou alcalinos e apresenta ampla tolerância à exposição ao vento, inundações, salinidade, competição com espécies alelopáticas, dentre outros fatores (NELSON, 2006).

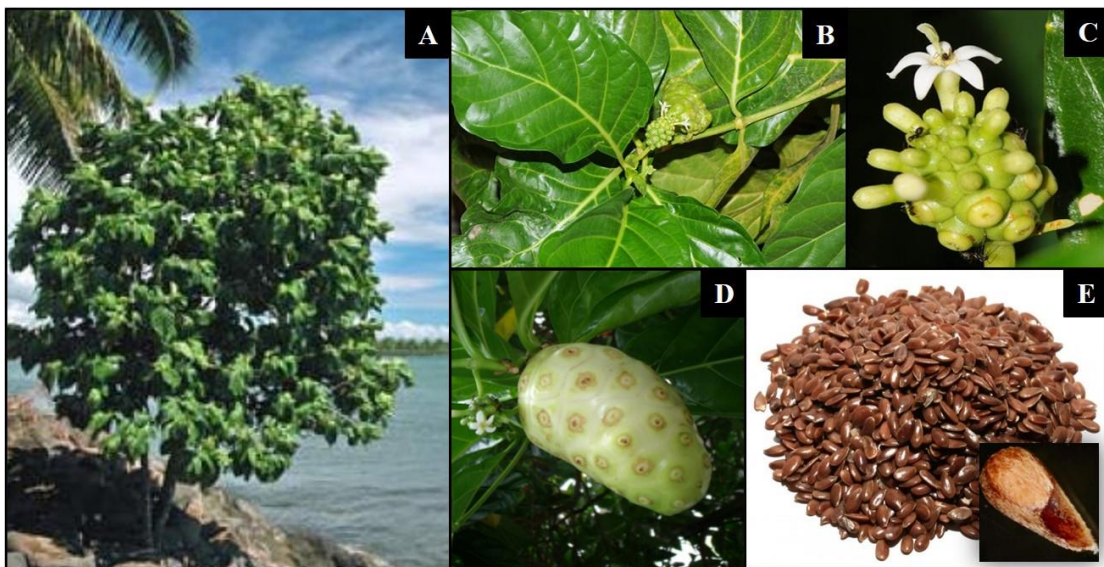
No Brasil é possível encontrar cultivos de noni nos estados do Acre, São Paulo, Minas Gerais, Pará, Sergipe e Ceará. (CORREIA *et al.*, 2011). Atualmente, existem duas variedades reconhecidas de *M. citrifolia* (*M. citrifolia* var. *citrifolia* e *M. citrifolia* var. *bracteata*) e uma cultivar (*M. citrifolia* cultivar *Potteri*), sendo a variedade *M. citrifolia* var. *citrifolia* a de maior importância econômica (ABOU ASSI *et al.*, 2017).

A espécie é um arbusto ou árvore pequena, possui folhas simples, largas, elípticas e opostas, com flores pequenas e tubulares agrupadas e inseridas no pedúnculo, apresentando corola branco-esverdeada (Figura 9A-C) (CHAN-BLANCO *et al.*, 2006). Seus frutos são

formados a partir de ovários de várias flores (infrutescência) e assumem um formato ovalado, com cerca de 14 cm de comprimento e 8 cm de diâmetro. São carnudos, ligeiramente enrugados e sua frutificação pode ocorrer no ano todo (Figura 9D). Apresentam pequenos botões marrom-avermelhados, cada um contendo quatro sementes. A polpa é succulenta com sabor amargo ou adstringente, coloração amarelo claro fosco ou esbranquiçado e apresentam um forte odor rançoso de ácido butírico, característico da fruta madura (MORTON, 1992).

Os frutos do noni são climatéricos e geralmente colhidos ainda verdes. De acordo com seu estágio de maturação, a coloração varia de amarelo a cinza esbranquiçado/translúcido e marrom, quando senescem, e essas mudanças ocorrem rapidamente após a colheita (MOTSHAKERI; GHAZALI, 2015). O fruto de noni pode conter até 260 sementes ovóides com cerca de 4-9 mm de comprimento e uma câmara de ar distinta (Figura 9E) (NELSON, 2006). É possível encontrar frutos em diferentes estágios de maturação em uma mesma planta e ao mesmo tempo.

**Figura 9.** Visão geral dos aspectos morfológicos de *Morinda citrifolia* L. (A) Planta adulta. (B) Folhas. (C) Flores. (D) Frutos. (E) Sementes.



Fonte: NELSON, 2006; <https://wiki.nus.edu.sg/>.

Quase todas as partes do noni, incluindo as raízes, caule, casca, frutos e folhas têm sido utilizadas na cura ou como medida preventiva no manejo de várias doenças agudas e crônicas na cultura polinésia nos últimos 2.000 anos (LOHANI *et al.*, 2019).

Considerando os estudos com compostos fitoquímicos, a literatura mostra que mais de 200 metabólitos já foram identificados e isolados de diferentes partes de *M. citrifolia*

(SINGH, 2012). As principais classes químicas isoladas de noni foram betalaínas, indóis, glucosinolatos, organossulfetos, sulfetos, compostos mono ou polifenólicos, terpenos (isoprenóides, terpenóides) e ácidos orgânicos (LOHANI *et al.*, 2019). Os principais ácidos orgânicos encontrados em *M. citrifolia* são os ácidos capróico e caprílico, enquanto o principal alcalóide relatado é a xeronina. Além disso, os compostos fenólicos foram considerados o principal grupo de micronutrientes funcionais no suco de *M. citrifolia* e incluem damnacanthal, escopoletina, morindona, alizarina, aucubina, nordamnacantal, rubiadina, éter de rubiadina-1-metilico e outros glicosídeos de antraquinona (AHMAD; DAUD; ISMAIL, 2016). O teor de proteína da fruta é surpreendentemente alto, representando 11,3% da matéria seca do suco, e os principais aminoácidos são ácido aspártico, ácido glutâmico e isoleucina. (CHAN-BLANCO *et al.*, 2006).

Diversas atividades biológicas têm sido atribuídas ao noni. O extrato de seus frutos apresentou ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio cholera*, *Chromobacterium violaceum*, *Enterococcus faecalis*, dentre outros (JAYARAMAN *et al.*, 2008). Efeitos hepatoprotetor e antidiplidemia já foram associados à atividade antioxidante presente em frutos, folhas e raízes do noni (LIN *et al.*, 2013; MANDUKHAIL *et al.*, 2010). Atividade anti-inflamatória tem sido reportada para frutos (SOUZA *et al.*, 2018) e sementes (CAMPOS *et al.*, 2017). Além disso, atividade antiartrítica (SARASWATHI *et al.*, 2012), anticâncer (JEYAPRAKASH; ALSALHI; DEVANESAN, 2020), antidiabética (PURANIK *et al.*, 2013), de cicatrização de feridas (LY *et al.*, 2020), gastroprotetor (MAHATTANADUL *et al.*, 2011), dentre outras, é relatada em extrato de folhas e frutos, diversas vezes associados a presença de compostos como polissacarídeos sulfatados, damnacanthal, ácido ursólico, rutina e escopoletina.

O noni tem sido objeto de estudos desenvolvidos pelo Laboratório de Química Medicinal do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, no qual esta tese foi desenvolvida. A partir das sementes dessa espécie foi isolada uma proteína transferidora de lipídeos, denominada *McLTP<sub>1</sub>*, que apresentou efeitos anti-inflamatório (CAMPOS *et al.*, 2017), antinociceptivo (CAMPOS *et al.*, 2016) e antibacteriano (SOUZA *et al.*, 2018).

Recentemente, foi observada a presença de peptidases no purê de noni, com ótimo de atividade em pH 6-7 na temperatura de 40-60 °C, utilizando-se azocaseína como substrato. A atividade proteolítica foi inibida em sua quase totalidade, quando o extrato foi incubado com E-64 (0,18 mM) e iodoacetamida 0,1 mM, indicando serem as mesmas, peptidases do tipo

cisteínicas (FARIAS *et al.*, 2020). Sua atividade proteolítica de 1718,69 UAP/g ultrapassa a da maioria dos vegetais, como é o caso do kiwi (*Actinidia deliciosa*), abacaxi (*Ananas comosus*), mamão (*Carica papaya*) e figo (*Ficus carica*) que apresentam uma média de 25,92 UAP/g (SUN *et al.*, 2016).

O potencial biotecnológico das peptidases do purê do fruto de noni também foi avaliado (FARIAS, 2020), onde estas se mostraram promissoras na coagulação do leite para produção de queijo que apresentaram qualidade semelhante aos produzidos com o uso de coalho comercial a base de quimosina. Esse processo de aplicação encontra-se descrito em patente depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI (Nº do registro BR1020170012646).

Alguns relatos de hepatotoxicidade têm sido associados ao consumo diário do suco de noni para fins terapêuticos, além de estudos *in vivo* em roedores (MOHAMAD SHALAN; MUSTAPHA; MOHAMED, 2017; YU *et al.*, 2011; STADLBAUER *et al.*, 2008; YÜCE *et al.*, 2006; MILLONIG; STADLMANN; VOGEL, 2005; STADLBAUER *et al.*, 2005), levando a US Food and Drug Administration, em 2004, a emitir advertências aos fabricantes de produtos não-especializados em relação a alegações de melhorias à saúde não comprovadas (LOHANI *et al.*, 2019) e a ANVISA a divulgar um informe técnico proibindo a comercialização de produtos à base de noni como alimento até que os requisitos legais que exigem a comprovação de sua segurança de uso sejam atendidos, por se tratar de um fruto sem histórico de consumo do Brasil (ANVISA, 2007). Por outro lado, a União Europeia aprovou o suco comercial de noni como um novo alimento, uma vez que nove anos e meio de vigilância pós-comercialização do suco Tahitian Noni revelaram que mais de 80 milhões de unidades foram vendidas e foram registradas somente 304 reclamações de consumidores relatando comprometimento da saúde (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2006). Outros estudos *in vivo* não identificaram efeitos tóxicos no fígado de roedores (ROSLY *et al.*, 2011; WEST *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2002; WEST *et al.*, 2009), demonstrando assim que a associação entre o suco dos frutos e lesões hepáticas permanece controversa.

Compostos ativos que podem estar dentro dos alimentos e bebidas que consumimos diariamente podem ser de duas origens principais: naturalmente incluídas ou adicionadas artificialmente. Os riscos ou benefícios de elementos ativos contidos nos alimentos dependem tanto de sua natureza química quanto de sua concentração. Alguns compostos podem ser tóxicos mesmo quando ingeridos em pequenas doses, enquanto outros passam a apresentar toxicidade apenas em dosagens elevadas (GHANEMI, 2015). Muitos alimentos integrais e ingredientes alimentares caracterizados são considerados seguros por meio de seu histórico de uso, muitas

vezes tradicional, na dieta humana. Onde esse histórico de uso seguro está ausente, os alimentos ou ingredientes em questão são vistos como "novos" e sujeitos ao controle pela legislação de novos alimentos (BLAAUBOER *et al.*, 2016). No Brasil essa legislação é estabelecida pela ANVISA que em seu documento Guia para a Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes (ANVISA, 2019) preconiza que a avaliação do risco da maioria das substâncias químicas adicionadas em alimentos é inteiramente dependente de estudos em animais e *in vitro*.

### **3 HIPÓTESE**

O extrato do purê de noni (*Morinda citrifolia* L.) constitui uma fonte de peptidases cisteínicas não tóxicas capazes de hidrolisar o glúten, sendo, portanto, um promissor ingrediente alimentar na produção de alimentos *glúten-free*.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivos gerais

- Avaliar a potencial de peptidases cisteínicas de NPE na hidrólise de proteínas do glúten de trigo;
- Avaliar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* de NPE visando seu uso como novo ingrediente alimentar.

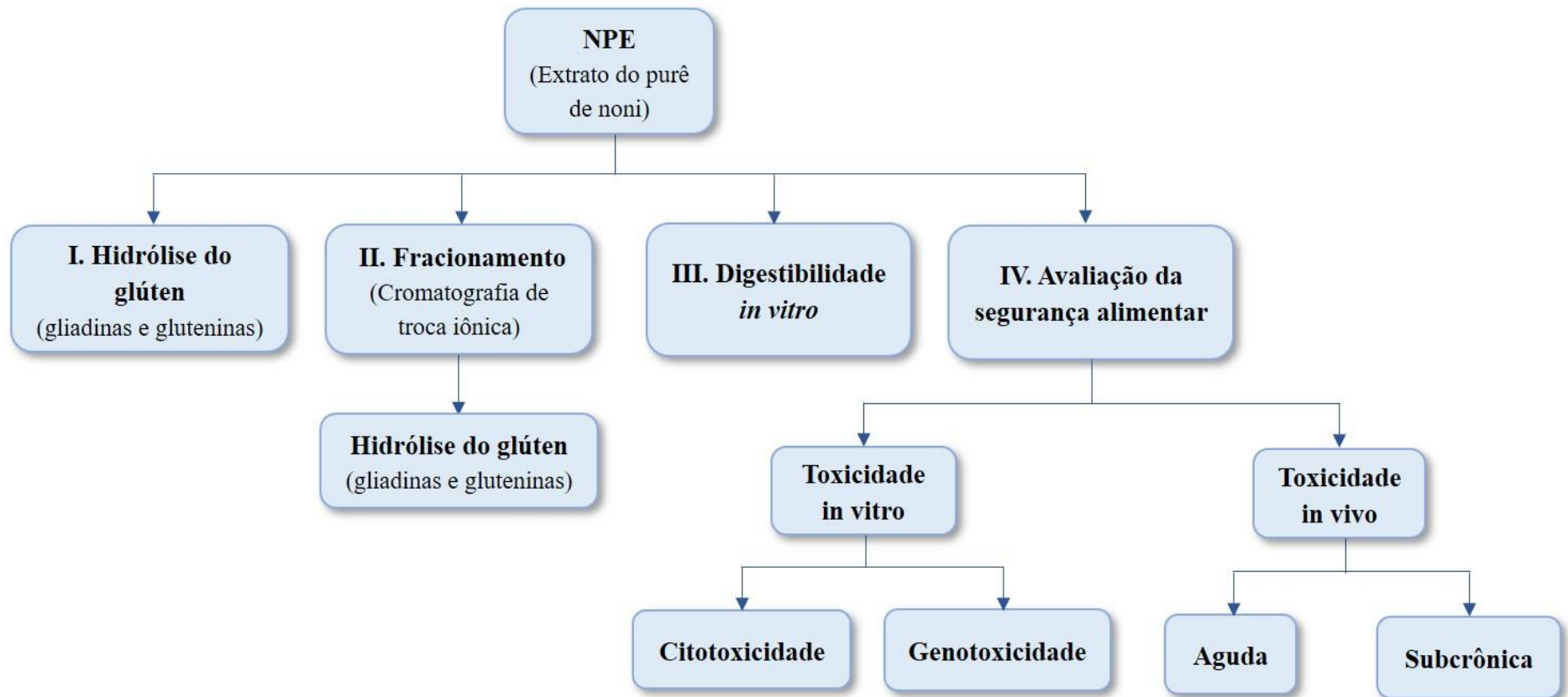
### 4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade de peptidases cisteínicas de NPE na hidrólise de gliadinas e gluteninas da farinha de trigo;
- Analisar o perfil de massa molecular de hidrolisados de gliadinas e gluteninas após hidrólise com NPE;
- Mensurar conteúdo de gliadinas intactas residuais após hidrólise com NPE.
- Fracionar peptidases cisteínicas de NPE e avaliar o desempenho na hidrólise das proteínas do glúten de trigo;
- Avaliar a susceptibilidade hidrolítica de proteínas de NPE frente às enzimas proteolíticas gastrointestinais;
- Avaliar o efeito tóxico de NPE sobre o DNA celular;
- Avaliar o efeito tóxico de NPE após administração em dose única e em doses repetidas em camundongos.

## 5 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Os resultados obtidos neste trabalho foram reunidos em um manuscrito e submetidos ao periódico Food and Chemical Toxicology (fator de impacto: 4.6), que se enquadra no extrato A1 do sistema Qualis/CAPES.

A estratégia experimental utilizada neste trabalho foi organizada de acordo com o organograma abaixo:





## **6 ARTIGO DA TESE**

**Cysteine peptidases from noni fruits (*Morinda citrifolia* L.) are promising in the hydrolysis of wheat gluten and safe as a new food ingredient**

**Cysteine peptidases from noni fruits (*Morinda citrifolia* L.) are promising in the hydrolysis of wheat gluten and safe as a new food ingredient**

Vilmara Albuquerque de Farias<sup>a</sup>, Rodolpho Glauber Guedes Silva<sup>a</sup>, Andréa Santos Costa<sup>a</sup>, Amanda Dias da Rocha Lima<sup>a</sup>, Ana Paula Negreiros Nunes Alves<sup>b</sup>, Marcus Davis Machado Braga<sup>b</sup>, Bruno Coêlho Cavalcanti<sup>b</sup>, Manoel Odorico de Moraes Filho<sup>b</sup>, Maria Elisabete Amaral de Moraes<sup>b</sup>, Hermógenes David de Oliveira<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Campus do Pici Prof. Prisco Bezerra, 60440-900, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>b</sup> Drug Research and Development Center, Federal University of Ceará, Campus do Porangabussu, 60430-270, Fortaleza, CE, Brazil

\* Corresponding author: [hermogenes@ufc.br](mailto:hermogenes@ufc.br) (**Hermógenes D. Oliveira**). Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Campus do Pici Prof. Prisco Bezerra, 60440-900, Fortaleza, CE, Brazil.

## Abstract

Previous reports have shown that noni (*Morinda citrifolia* L.) puree extract (NPE) is a promising source of cysteine peptidases with potential applications in the food industry. This work aimed to expand its applications by analyzing the potential of NPE in wheat gluten hydrolysis and assessing its safety as a new food ingredient. NPE cysteine peptidases hydrolyze both gliadins and glutenins, reaching a degree of hydrolysis (DH) of 24.40% and 31.78%, respectively. NPE reduced 96.80% of gliadin content after 4 h detected by R5 ELISA. The fractionation of NPE (Source 30S) resulted in an unretained (P1) and a retained peak (P2) that showed proteolytic activity with different electrophoretic and zymographic profiles. P1 and P2 had similar ( $p < 0.05$ ) DH in gliadins (about 9%). P1 performed better (10.68%) in glutenins compared to P2 (8.55%). NPE did not show cytotoxicity or genotoxicity. Acute and subchronic toxicity studies in mice proved that NPE (5, 10, and 20 mg/kg) was not likely to induce changes indicative of toxicity, compared to control, in animal mass, hematological and biochemical parameters, relative weight, and histopathology of organs analyzed. These findings suggest that NPE has excellent potential to be used as a new safe ingredient for the production of gluten-free foods.

**Keywords:** *Morinda citrifolia* L.; cysteine peptidases; gluten; oral toxicity; genotoxicity.

**Abbreviations:** NPE, noni puree extract; DTT, dithiothreitol; CD, celiac disease; NCGS, non-celiac gluten sensitivity; OPA, ortho-phthalaldehyde; MTT, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2Htetrazolium bromide; MMS, methyl methanesulfonate, DXR, doxorubicin; MN, micronucleus; DH, degree hydrolysis; HMW-GS, high molecular weight; LMW-SG, low molecular weight subunits; WBC, white blood cells; LYM, lymphocytes; GRA, granulocytes;

RBC, red blood cells; HGB, hemoglobin; HCT, hematocrit; MCV, mean cell volume; MCH, mean cell hemoglobin; MCHC, Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration; RDW, Red Cell Distribution Width; PLT, platelet; PCT, plateletcrit; MPV, mean platelet volume; PDW, platelet distribution width; ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase.

## **1 Introduction**

Peptidases are enzymes capable of hydrolyzing proteins, being exploited for numerous biotechnological applications with commercial added value (Tavano *et al.*, 2018). Apart from milk coagulation use, peptidases have also been employed as a powerful tool in the food industry to improve the properties of the food matrix, changing the sensory and nutritional quality, increasing the digestibility, delaying spoilage, improving functional properties, producing bioactive peptides, or decreasing allergenicity of proteins, such as gluten (Tavano *et al.*, 2018).

Wheat gluten (gliadins and glutenins) is essential for the bakery industry due to its unique performance in forming a viscoelastic network in products based on wheat flour (Wieser, 2007). Gluten is a group of storage proteins found in wheat, barley, rye, and oat varieties. Unfortunately, some disorders are associated with these proteins, mainly gliadins: celiac disease (CD), gluten/wheat allergy, and non-celiac gluten sensitivity (NCGS).

Nowadays, the most widespread treatment for those disorders is a lifelong gluten-free diet. Most gluten-free products available on the market are based on naturally gluten-free grain flours. However, these products are often inferior to their corresponding wheat-based products in flavor, color, texture, and mouthfeel. Among the strategies for gluten detoxification, peptidases are an exciting alternative in food processing (Scherf *et al.*, 2018). Peptidases have already been marketed in specific formulations as an adjuvant in gluten-free diets

(Krishnareddy *et al.*, 2017). Moreover, some peptidases have been tested in clinical trials, such as prolyl endopeptidases (PEP) from *Flavobacterium meningosepticum*, *Aspergillus niger*, *Myxococcus xanthus*, and *Sphingomonas capsulata*; glutamine-specific cysteine endopeptidase (EP-B2) from seeds of germinating barley; and subtilisin from *Rothia bacteria* (Wei *et al.*, 2020).

A study published by our research group identified peptidases in the puree extract of the fruits of *Morinda citrifolia* L., which was named NPE (Farias *et al.*, 2020). These peptidases had an optimum pH of 6-7 and activity in a temperature range of 40-60 °C, with an optimum at 50 °C. Noni puree peptidases were inhibited by E-64 and iodoacetamide, indicating that they belong to the group of cysteine peptidases. These peptidases were able to coagulate the milk and proved to be good ingredients for cheese production. Given the high proteolytic activity in noni fruit puree, it is interesting to explore further the biotechnological potential of these peptidases in the hydrolysis of other food proteins of industrial interest, such as gluten.

This research aimed to investigate the potential application of NPE in the hydrolysis of wheat gluten proteins. Furthermore, considering its use as a new food ingredient, the acute and repeated dose toxicity profile, genotoxicity, and *in vitro* cytotoxicity of NPE were studied.

## **2 Materials and methods**

### *2.1 Chemicals*

Chemicals used in this study were of the highest purity grade available and were obtained from Merck Brazil unless otherwise specified. The ELISA test RIDASCREEN® Gliadin sandwich (Art. No. R7001) was obtained from R-Biopharm®. The wheat flour Dona Benta® was purchased at the local market (Fortaleza, CE, Brazil). The kits for hematological and biochemical analysis of blood serum were obtained from Labtest Diagnóstica S.A. Fetal

bovine serum, DMEM medium, trypsin-EDTA, glutamine, penicillin, and streptomycin were purchased from GIBCO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Low-melting point agarose and agarose were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Cytochalasin-B, methyl methanesulfonate, doxorubicin, ortho-phthalaldehyde (OPA), trypsin from bovine pancreas (EC 3.4.21.4), and pepsin from porcine gastric mucosa (EC 3.4.23.1) were purchased from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

## 2.2 Plant material and protein extraction

*M. citrifolia* L. fruits were manually harvested at the pale-yellow stage of maturity from plants located in Fortaleza, Ceará, Brazil (3°44'24.1" S 38°34'36.2" W). The fruits were washed with distilled water and stored at 25 °C for 3–4 days until the translucent-greyish stage. The noni puree was obtained using a sieve to eliminate the peel and seed. Afterward, it was used for the extraction of proteins, according to Farias (2020). The resulting extract was named noni puree extract (NPE), and the quantification of total soluble proteins (Bradford, 1976) and proteolytic activity (Freitas *et al.*, 2007) were determined. NPE was lyophilized and stored at -20°C until further use. Before each assay, NPE was resuspended in  $1 \times 10^{-3}$  M L-cysteine solution. This study was registered in the SisGen - National Management System for Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen - nº A174C2B).

## 2.3 Hydrolysis of wheat gluten proteins with NPE

The gluten proteins hydrolysis by NPE was conducted using whole wheat flour. Commercial wheat flour (Dona Benta®) (50 g) was mixed with 28 mL of NPE (0.2 mg/mL - 1.77 U/mL) solubilized in L-cysteine ( $1 \times 10^{-3}$  M) previously incubated at 37 °C. The dough was kneaded manually for 10 min and remained at rest for 30 min. Then, it was washed thoroughly in tap water for approximately 30 min to remove the starch. At this stage, the

formation of the insoluble protein matrix (gluten) was verified visually. Control was carried out using only wheat flour with distilled water in the same ratio. This test was performed in triplicate, and the results were presented through the photograph.

The hydrolysis reaction using the gliadins and glutenins extracted from wheat flour was also conducted. Gluten proteins were obtained from commercial wheat flour (Dona Benta®) according to Singh *et al.* (1991). Briefly, 2 g of wheat flour was mixed in 10 mL of 50% isopropanol and stirred for 30 min at room temperature. Then, the suspension was centrifuged at 2,500 x g for 15 min at 25 °C. The supernatant was stored and called the 1st gliadin extract. This process was repeated twice to obtain the 2nd and 3rd gliadin extract. The three gliadins extracts were combined. Subsequently, the precipitate was resuspended in 50% isopropanol, 0.05 M Tris-HCl pH 7.0, and 1% DTT. The mixture was kept in a water bath at 60 °C for 30 minutes, stirring every 5 or 10 minutes, and centrifuged at 10,000 g for 15 min at 25 °C. The supernatant was called glutenin extract.

Protein hydrolysis were analyzed using different NPE protein/gliadins or glutenins concentration ratios, as follows: 1:2000, 1:200, and 1:20 (2 mg/mL gliadins or glutenins; 0.001, 0.01, and 0.1 mg/mL NPE - 0.009, 0.088, and 0.885 U/mL). Hydrolysis with higher concentration ratios (1:10, 1:7; 1:5, 1:2.5, and 1:1.25) varying the concentration of gliadins (0.2 mg/mL NPE - 1.77 U/mL; 2.0, 1.5, 1.0, 0.5, and 0.25 mg/mL gliadins) were also carried out. The reactions were carried out at 37 °C for 60 min and then boiled for 10 min to inactivate the enzymes. Besides, different hydrolysis times of gliadins and glutenins (30, 60, 90, 120, and 150 min) in the ratio of 1:10 were evaluated. All hydrolysates profiles were analyzed using 10% SDS-PAGE electrophoresis gel (Laemmli, 1970).

#### 2.4 Hydrolysis degree

Primary amino groups were determined after derivatization with ortho-phthalaldehyde (OPA), according to Nielsen *et al.* (2001). Lyophilized extracts of glutenins and gliadins (0.2 mg/mL) were resuspended separately in cysteine solution ( $1 \times 10^{-3}$  M) and boiled for 10 min. After cooled, NPE (in  $1 \times 10^{-3}$  M cysteine solution) was added in different concentrations (0.01; 0.02; 0.04 and 0.2 mg/mL of protein; concentration ratios of 1:20, 1:10; 1:5 and 1:1, respectively) and the reaction occurred at 37 °C. After different time intervals (0, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, and 240 min), aliquots (600  $\mu$ L) were removed, boiled for 10 min, and then centrifuged at  $10,000 \times g$  for 15 min. The pellet was discarded, and 3 mL of OPA reagent was added to 0.4 mL of the supernatants, and after 2 min, the absorbance was measured ( $\lambda=340$  nm). Blanks were prepared with supernatant of hydrolysis at time 0. The hydrolysis degree (DH) was determined based on a standard curve performed with L-serine ( $0.07 \times 10^{-3}$  –  $0.9 \times 10^{-3}$  M). DH was calculated according to Merz *et al.* (2016), using the following formulas: (1) **DH (%) =  $h / h_{\text{tot}} \times 100$** , where  $h$  is the concentration of free amino groups (mol/L, considering serine as standard) and  $h_{\text{tot}}$  is the maximum concentration of free amino groups at complete hydrolysis (mol/L) calculated according to (2)  **$h_{\text{tot}} (\text{mol/L}) = C_{\text{protein}} / M^* - M_{\text{H}_2\text{O}}$** , where  $C_{\text{protein}}$  is the concentration of protein which is hydrolyzed (g/L),  $M^*$  is the average molecular mass of the amino acids in wheat gluten (133.5 g/mol) and  $M_{\text{H}_2\text{O}}$  is the molecular mass of water (18 g/mol). All analyses were carried out in triplicates.

### 2.5 Gliadin content

Gliadin extract (2 mg) was resuspended in 10 mL of cysteine solution ( $1 \times 10^{-3}$  M), boiled for 10 min, being cooled before mixed with NPE (0.2 mg/mL of protein) in the concentration ratio of 1:1. The mixture was incubated in a water bath at 37 °C for 0, 1, 2, 3, and 4 h. Afterward, the hydrolysates were boiled to inactivate the enzymes and lyophilized.



Sample preparation was performed by extracting the gliadin from hydrolysates using the extraction Cocktail patented (R-Biopharm®) as recommended by the manufacturer. The gliadin quantitative analysis was conducted in triplicates with the sandwich R5 ELISA (RIDASCREEN® Gliadin kit). The manufacturers' instructions for proper use were followed. The data were expressed as a percentage of the gliadin content determined at zero, considered 100%.

### *2.6 Biochemical fractionation of NPE peptidases and evaluation of their performance in the hydrolysis of wheat gluten*

NPE was subjected to ion-exchange chromatography in the SOURCE 30S matrix (GE Healthcare). The ion-exchange column was equilibrated with 0.025 M sodium phosphate buffer, pH 6.0. After equilibration, the NPE (7.2 mg of protein;  $8.859 \pm 0.216$  U/mg) was loaded onto the column. Unbound proteins were eluted from the matrix by washing it with the equilibration buffer. Bound proteins were eluted with 0.025 M sodium phosphate buffer pH 6.0 containing NaCl (0.2; 0.4; 0.6; 0.8 and 1.0 M). All the eluates were collected in fractions of 2 mL at a flow rate of 60 mL/h and monitored by spectrophotometry ( $\lambda=280$  nm). Fractions were assayed for peptidase activity using azocasein as a substrate (Freitas *et al.*, 2007), and protein concentration was determined according to the Bradford method (Bradford, 1976) using BSA as standard. The protein profile was analyzed using SDS-PAGE (Laemmli, 1970) and zymogram (Damerval *et al.*, 1986). Subsequently, the fractions that showed proteolytic activity were dialyzed against distilled water, lyophilized, and stored at  $-20$  °C until further testing.

Chromatographic fractions were resuspended in a cysteine solution ( $1 \times 10^{-3}$  M) and mixed with gliadin or glutenin (2 mg/mL) extracts separately in the concentration ratio of 1:8, 1:16, and 1:32. The hydrolysis conditions were carried out as previously described in subsection 2.3. After 60 min, the mixture was boiled, and the hydrolysates profiles were evaluated using

SDS-PAGE (10%). The DH of the fractions was also determined. To this, suspensions of gliadins and glutenins (0.2 mg/mL) resuspended in a cysteine solution ( $1 \times 10^{-3}$  M) were used, and the hydrolysis occurred in the fraction/substrate ratio of 1:10. The procedure was conducted as described in subsection 2.4.

### *2.7 In vitro digestion assay*

In vitro digestibility of NPE proteins was determined according to the method of Sathe (1993). NPE (1 mg/mL) was suspended in 200  $\mu$ L of 0.1 M HCl, pH 1.8, for pepsin (from porcine gastric mucosa, Sigma-Aldrich) or 0.1 M Tris-HCl, pH 8.1 for trypsin (from bovine pancreas, Sigma-Aldrich) being incubated at 37 °C for 10 min. Then, 40  $\mu$ L of the enzyme (1 mg/mL) was added, and the reaction medium was set in a water bath at 37 °C for 3 h. Aliquots of 25  $\mu$ L were taken from 0 to 4 h with time intervals of 1 h and added to 25  $\mu$ L of 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 6.8, containing 0.1% SDS. The enzymes were inactivated by heating in boiling water (98 °C – 10 min). The hydrolysis profile was analyzed by 12.5% SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

### *2.8 In vitro toxicity of NPE*

#### *2.8.1 Cell culture conditions*

The L929 mouse fibroblasts were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (Rio de Janeiro, Brazil). The cells were maintained in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, glutamine ( $2 \times 10^{-3}$  M), penicillin (100 U/mL), streptomycin (0.1 mg/mL) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>.

#### *2.8.2 Cellular viability*

The cell viability was quantified by the ability of cells to reduce the yellow dye 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) to a purple formazan product (Mosmann, 1983). L929 cells were plated in 96-well plates ( $0.3 \times 10^6$  cells/well). After 24 h, NPE (0.01-0.08 mg/mL in 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 6.0) was added to each well, and the cells were incubated for 24 h. After, the medium was replaced by a fresh medium (150  $\mu$ L) containing MTT (0.5 mg/mL). Three hours later, the MTT formazan product was dissolved in 150  $\mu$ L of DMSO, and absorbance was measured using a plate reader (Spectra Count, Packard, Ontario, Canada). The effect of NPE was quantified as the percentage of the reduced dye at 595 nm taking cell control (PBS) absorbance as 100%. Doxorubicin was used as positive controls ( $5 \times 10^{-3}$  mg/mL).

### 2.8.3 Alkaline comet assay

This assay was performed as described by Singh *et al.* (1988) with minor modifications. After treatment (6 h) with NPE (0.01-0.6 mg/mL), cells were washed with ice-cold PBS, trypsinized, and resuspended in a complete medium. Hereafter, 20  $\mu$ L of cell suspension ( $\sim 10^6$  cells/mL) was mixed with 100  $\mu$ L of 0.75% low melting point agarose and spread onto a slide precoated with a layer of 1% normal melting point agarose and cooled to 4 °C for 5 min. The slides were incubated in ice-cold lysis solution (2.5 M NaCl, 0.01 M Tris, 0.1 M EDTA, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH 10.0) at 4 °C for 1 h. After lysis, the slides were placed in a running buffer (0.3 M NaOH and  $1 \times 10^{-3}$  M EDTA, pH > 13.0) for 20 min and subjected to electrophoresis run (25 V, 0.3 A). The slides were neutralized and stained with ethidium bromide and analyzed using a fluorescence microscope. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed for each concentration of NPE. Cells were scored visually and assigned to one of five classes, according to tail size (from undamaged-0 to maximally damaged-4), and a damage index value was calculated for each

sample of cells. Damage index ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells x 4) (Collins, 2004). Methyl methanesulfonate (MMS) was used as a positive control ( $4.4 \times 10^{-3}$  mg/mL), and negative control was performed with PBS.

#### 2.8.4 Cytokinesis-block micronucleus (MN) assay

Fibroblasts L929 ( $0.7 \times 10^5$ /mL) were treated with NPE (0.01-0.6 mg/mL) for 24 h, and they were subsequently washed twice with the medium. Cytochalasin-B ( $3 \times 10^{-3}$  mg/mL) was added to cultures 20 h later, as Fenech (2000) described. Cells were harvested 72 h after the treatment starting point, resuspended in 0.075 M KCl, kept at 4 °C for 3 min, and fixed with cold methanol/acetic acid (3:1) solution. The fixation step was repeated twice, and then the cells were resuspended in a small volume of methanol/acetic acid and dropped onto clean slides. Slides were stained with 10% Giemsa (pH 6.8) for 6 min and analyzed under a microscope. Micronuclei were counted in 2000 binucleated cells (BNC) with well-preserved cytoplasm. MMS ( $4.4 \times 10^{-3}$  mg/mL) were used as positive controls, and for the negative control, only PBS buffer was used.

### 2.9 *In vivo* toxicity of NPE

#### 2.9.1 Experimental animals and housing conditions

The present study used albino Swiss mice (*Mus musculus*) at 8 weeks old (21-29 g) from both sexes (39 females and 24 males). The animals with sanitary standard SPF (Specific Pathogen Free) were supplied by the Central Animal House of the Federal University of Ceará (UFC), Brazil. Male and female mice were housed separately in sterile polysulfone cages with a HEPA filter cover under controlled laboratory conditions (temperature:  $24 \pm 1$  °C, humidity: 45-65 %, light/dark cycle: 12/12 h) with water (autoclaved) and food *ad libitum*. All animals

were treated in compliance with the ethical standards established by the National Guidelines for the Use of Experimental Animals of Brazil and Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of the European Union. The experiments were performed after approval of the Committee for the Ethical Use of Animals of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC Proc. N° 21051119-0).

### *2.9.2 Acute toxicity study*

A single oral dose toxicity study in rodents was conducted following OECD guideline 423 (OECD, 2001). Six non-pregnant nulliparous females were randomly divided into three groups (3 females mice/group), which received vehicle (0.9 % saline; control) or NPE (80 and 160 mg/kg) once by oral route. After administration, all animals were observed every hour for 6 h on the first day and then once daily for 14 days. Body weights were registered once a week after administration of NPE. Mortality (if any) and abnormality were also recorded. At the end of the study, the animals were euthanized by xylazine (30 mg/kg) and ketamine (300 mg/kg) overdose, dissected, and the organs (heart, lung, kidney, spleen, pancreas, small intestine, stomach, and liver) were excised, weighed and visually inspected.

### *2.9.3 Repeated dose 28-day oral toxicity study*

This study was conducted following a standardized protocol set by the OECD guideline 407 (OECD, 2008). Forty-eight mice were divided into four groups, six males and six females in each group. Male and female mice in each group were housed separately and treated orally (gavage) once daily with NPE for 28 days. Grouping was as follows: Group 1 – Control (0.9 % saline); Group 2 – dose of 5 mg/kg NPE; Group 3 – dose of 10 mg/kg NPE and Group 4 – dose of 20 mg/kg NPE. The signs of toxicity, behavioral changes, food consumption, and mortality were closely monitored during the treatment. Motor activity, grooming, touch response, pain

response, tremors, convulsion, righting reflex, writhing, urination, salivation, and skin color were also evaluated throughout the study.

#### *2.9.4 Hematology and serum biochemistry*

On the 29<sup>th</sup> day of the experiment, blood sampling was performed by the cardiac puncture method from all animals under xylazine (10 mg/kg) and ketamine (90 mg/kg) anesthesia. Blood samples were collected into tubes containing EDTA (2.3 mg/mL) for the hematology assessment. The following hematological parameters were analyzed with the fully automated hematology analyzer SDH-3 VET (Labtest Diagnóstica S.A., Brazil): hematocrit (HCT) red blood cell (RBC), white blood cell (WBC), lymphocytes (LYM), granulocytes (GRA), hemoglobin (HGB), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean corpuscular volume (MCV), red cell distribution width (RDW), plateletcrit (PCT), platelet (PLT), mean platelet volume (MPV) and platelet distribution width (PDW)

Serum biochemistry was analyzed using the appropriate kits (Labtest Diagnóstica S.A., Brazil) to determine glucose, cholesterol, total protein, albumin, uric acid, urea, creatinine, alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) following the manufacturer's instructions.

#### *2.9.5 Macroscopy and histopathology*

At the end of the experiment, all animals were weighed, euthanized by exsanguination, and underwent complete gross necropsy. The organs (heart, lung, kidney, spleen, pancreas, small intestine, stomach, thymus, and liver) were collected and weighed. Organ-to-body weight ratios (relative organ weight) were calculated as  $(\text{organ/body weight}) \times 100$ . Organs from each animal were fixed in 10% buffered formalin (sodium phosphate pH 7.0), embedded in paraffin,

sectioned, stained with hematoxylin and eosin. Histopathological examinations were conducted randomly and blindly under a light microscope. Only the results for the high-dose and control groups were presented.

### *2.10 Statistical analysis*

All statistical analysis was performed using GraphPad Prism software v.9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Means were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test. Results with P values of less than 0.05 were considered statistically significant.

## **3. Results and discussion**

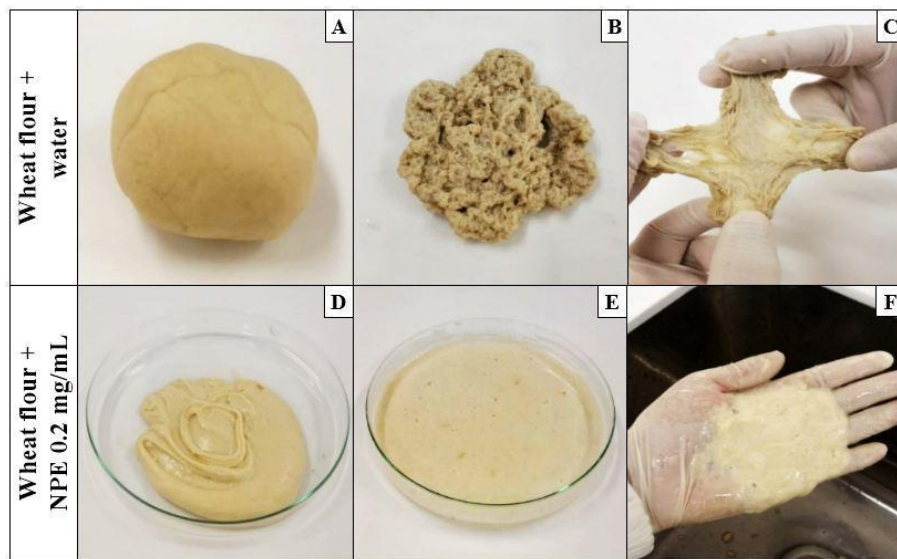
### *3.1 Hydrolysis of wheat gluten by NPE*

Plant peptidases have been used in worldwide processes for a long time, even before the nature and properties of these enzymes were known. Peptidases such as papain, bromelain, and ficin are versatile and used in various fields, including milk coagulation, brewing, and meat tenderization (Tavano *et al.*, 2018). Previously, noni (*Morinda citrifolia* L.) puree showed high proteolytic activity ( $8.859 \pm 0.216$  U/mg) with the presence of cysteine peptidases that proved to be important in the coagulation of casein for cheese production (Farias *et al.*, 2020). However, noni as a source of promising peptidases has yet to be explored regarding its biotechnological potential.

Wheat flour hydrolysis was conducted as a preliminary test to understand noni peptidases' potential in modifying other food proteins. One way to visualize the formation of the wheat gluten network is by kneading the dough obtained after mixing the wheat flour with water. During this process, there is an interaction between gliadins and glutenins through inter-

and intra-chain disulfide bridges and cross-linked covalent bonds forming a network (Wiser, 2007).

Figure 1 (A-C) shows that the mixture of wheat flour with distilled water formed dough with firm consistency due to the previously described interactions between intact gliadins and glutenins. On the contrary, in the presence of NPE (0.2 mg/mL - 1.77 U/mL), the dough presented a pasty consistency, and after washing, it was not possible to extract the insoluble gluten network, indicating that the interaction of gluten proteins was impaired, probably due to the hydrolysis of these proteins (Fig. 1D-F). To prove this hypothesis, gliadins and glutenins were extracted separately, and their breakdown by NPE was monitored.



**Fig. 1.** Comparison between the visual aspects of dough and gluten obtained from the mixture of wheat flour with distilled water or NPE aqueous solution (0.2 mg/mL) in the presence of L-cysteine ( $1 \times 10^{-3}$  M). (A) Dough obtained from wheat flour and distilled water after 30 min, (B) gluten after washing with tap water the dough to remove the starch, and (C) wheat gluten with preserved viscoelastic properties. (D) Dough obtained from wheat flour and NPE after 30 min and (E-F) gluten obtained from wheat flour and NPE after washing. The dough was prepared in the ratio of 50 g/ 28 mL.



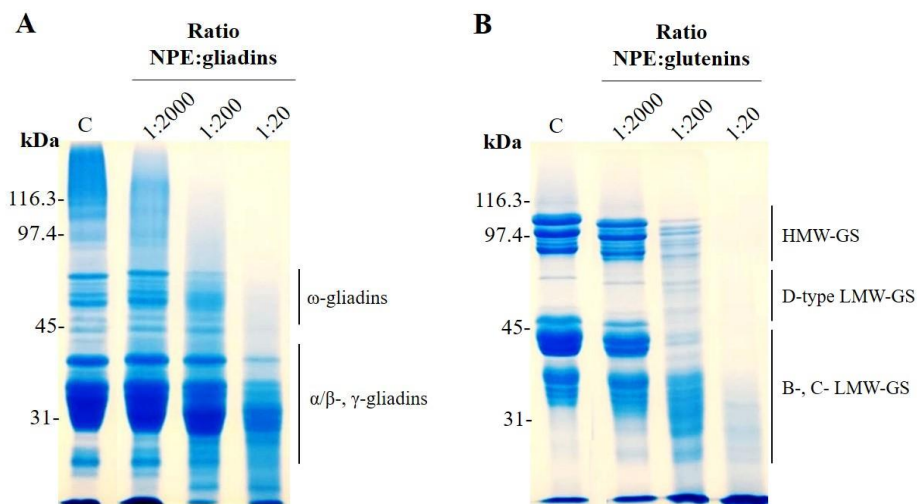
SDS-PAGE analysis of the hydrolyzates confirmed that NPE could hydrolyze both gliadins and glutenins (Fig. 2). Hydrolysis occurred with the gliadin and glutenin extract with different concentrations of NPE proteins (0.001, 0.01, and 0.1 mg/mL) in the concentration ratios of 1:2000, 1:200, and 1:20 (NPE:gliadin or glutenin) for 90 min. The hydrolysis rate depended on the NPE protein/substrate ratio and occurred to a greater extent with the ratio 1:20 (0.44 U/mg of gliadin or glutenin) for both gliadins and glutenins. At all the concentrations tested, NPE decreased the number and density of the glutenin protein bands.

The influence of hydrolysis time was also assessed in this study (Fig. 3). It was observed that there was no apparent difference in the intensity of the gliadin and glutenin bands after 30 min of reaction with NPE (0.1 mg/mL - 0.88 U/mL). In this case, time after 30 min seems not to have been a determining factor in increasing the hydrolysis rate. Even after 150 min of incubation, many gliadin bands were still visualized. For this reason, a new condition was tested in which the gliadin concentration was varied (Fig. 4). It was observed that as the ratio between NPE and gliadin increased, the intensity of the gliadin bands was drastically decreased. When the 1:10 ratio was used, there was a remarkable decrease in the number of bands compared to the 1:20 ratio. At the 1:2.5 ratio, an almost complete reduction of gliadin bands was observed, indicating that NPE could hydrolyze the different types of gliadins. It is noteworthy that the proteolytic activity of NPE is not inhibited by alcohols, isopropanol, and ethanol (data not shown). This factor may be of interest to the industry as it may enable its use in the degradation of gluten in the manufacture of gluten-free beers.

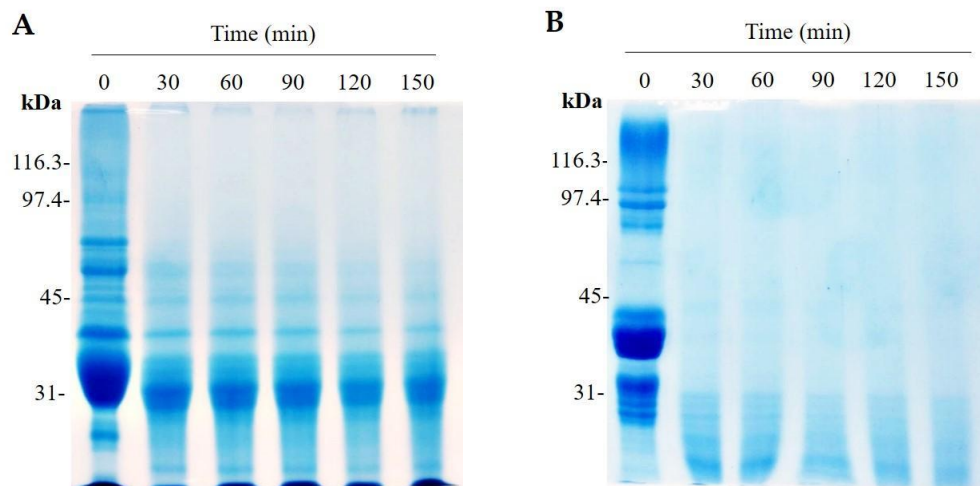
The potential of NPE in the hydrolysis of the two gluten fractions is remarkable because immunogenic peptides in celiac disease have been described in  $\alpha$ -,  $\omega$ -,  $\gamma$ -gliadins, and glutenins (LMW-GS and HMW-GS) from wheat and also in other gluten-containing grains such as barley (hordein) and rye (secaline). Gastrointestinal enzymes such as pepsin, chymotrypsin, and

trypsin are unable to cleave at peptide bonds adjacent to the proline and glutamine residues, resulting in large peptides with more than nine amino acid residues (Scherf *et al.*, 2018). Gliadins and glutenins also constitute the group of wheat allergens along with  $\alpha$ -amylase inhibitors, LTP,  $\beta$ -amylase, among others (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee). Therefore, the hydrolysis of these proteins opens the prospect of developing gluten-free products.

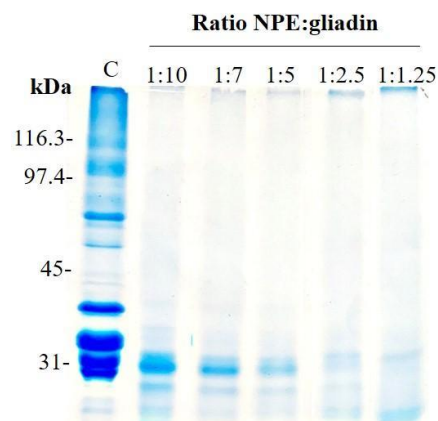
Plant peptidases have been promising in the hydrolysis of gluten, such as caricain (*Carica papaya*), EP-B2 (*Hordeum vulgare*), actinidin (*Actinidia deliciosa*), papain (*Carica papaya*), and triticain- $\alpha$  (*Triticum*). For noni fruits, this is the first report addressing their ability to hydrolyze gluten proteins. The use of NPE as a food ingredient is interesting, considering the low cost and ease of obtaining it.



**Fig. 2.** SDS-PAGE (10%) of (A) gliadins and (B) glutenins after hydrolysis with different concentrations ratios of NPE for 90 min at 37 °C. HMW-GS, high-molecular-weight glutenin subunits. LMW-GS, low-molecular-weight glutenin subunits. C, control (intact gliadins or glutenins)



**Fig. 3.** SDS-PAGE (10%) of (A) gliadins and (B) glutenins after hydrolysis with NPE (0.1 mg/mL) in the concentration ratio of 1:20 at different incubation times at 37 °C.



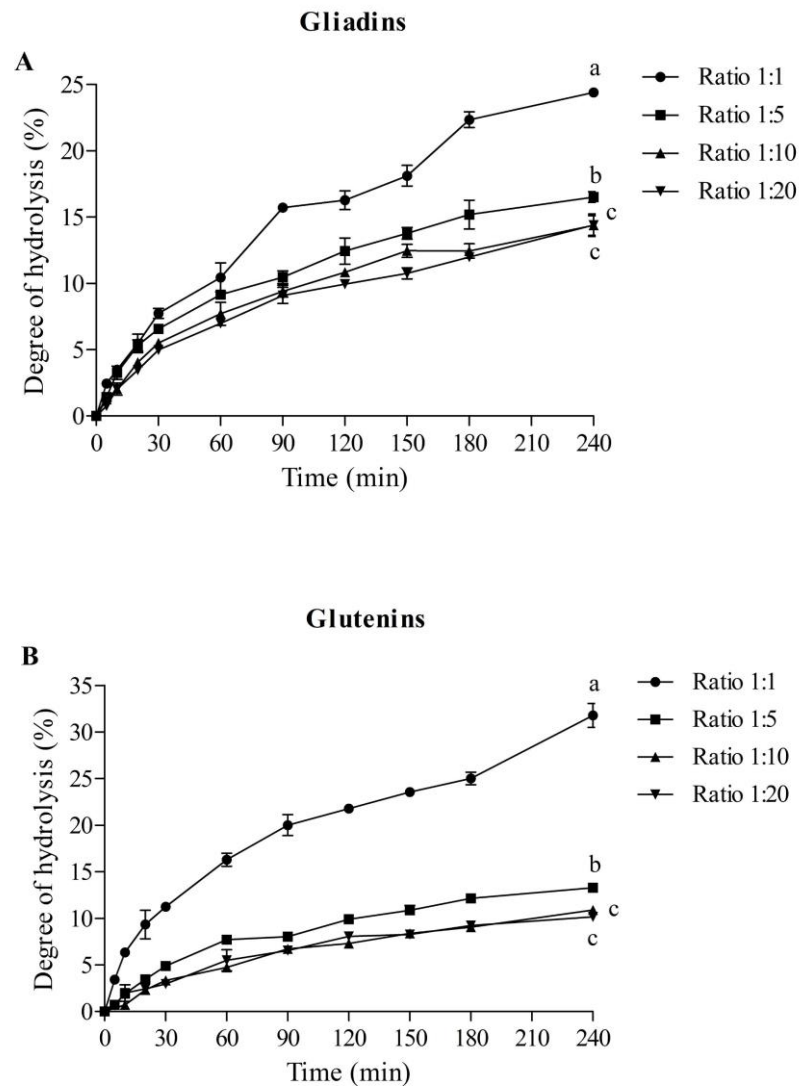
**Fig. 4.** SDS-PAGE (10%) of gliadins (8 µg) hydrolyzed by NPE for 60 min at 37 °C. Gliadin concentration varied in order to obtain the concentration ratios 1:10, 1:7, 1:5, 1:2.5 and 1:1.25 (NPE protein:gliadin). NPE concentration: 0.2 mg/mL. C, control (intact gliadin).

### 3.2 Effect of NPE protein/substrate ratio on the degree of hydrolysis of gluten proteins

Hydrolysis results of the NPE peptidases on gluten proteins are shown in Fig. 5. In this study, we decided to use a low concentration of gluten proteins since gliadins and glutenins have low water solubility and generally in higher concentrations form aggregates that could

hinder the access of enzymes during hydrolysis. The variation of DH was dependent on the NPE protein/substrate ratio. Treatment of gliadin (Fig. 5A) with NPE resulted in DH of 14.39% ( $\pm 0.84$ ) and was reached after hydrolysis for 240 min with a ratio of 1:20 (0.44 U/mg of gliadin). The increase of ratio to 1:10 (0.88 U/mg of gliadin) did not induce an increase in DH ( $p < 0.05$ ), whereas, with the rise in the ratio to 1:5 (1.77 U/mg of gliadin) and 1:1 (8.85 U/mg of gliadin), there was an increase in DH ( $p < 0.05$ ) to 16.52% ( $\pm 0.41$ ) and 24.40% ( $\pm 0.09$ ), respectively. This result agrees with what was observed in the electrophoretic analyses (Fig. 3 and 4), in which the increase in the NPE: gliadin ratio increased the hydrolysis rate, as evidenced by the apparent decrease in the intensity of protein bands. The treatment with NPE showed performance similar to that observed for other enzymes, such as alcalase and actinidin, that could promote DH of 12.4% and 22% after 2 h in gliadins (Villemin *et al.*, 2020; Jayawardana *et al.*, 2021).

Increasing NPE concentration also resulted in an increased glutenin hydrolysis rate. (Fig. 5B). After hydrolysis for 240 min, the curves of DH with ratios of 1:20 and 1:10 were similar ( $p < 0.05$ ),  $10.16 \pm 0.22\%$  and  $10.89 \pm 0.07\%$ , respectively. With the increase of the ratio to 1:5 and 1:1, the DH increased ( $p < 0.05$ ) to  $13.27\% (\pm 0.14)$  and  $31.78\% (\pm 1.28)$ , respectively. Data in the literature show that hydrolysis of glutenins by other purified enzymes such as Flavourzyme (*Aspergillus oryzae*), Alcalase<sup>®</sup> (*Bacillus licheniformis*), Savinase 16.0L (*Bacillus sp.*), and subtilisin (*Bacillus licheniformis*) after 4 h resulted in DH of approximately 5%, 3%, 23%, and 25%, respectively (Bozkurt *et al.*, 2021). It is noteworthy that NPE is a pool of proteins, including cysteine peptidases and that the proportions used in this work considered the concentration of soluble NPE proteins. NPE performed similarly and, in some cases, superior to those purified enzymes. These findings reinforce the potential of NPE as a food ingredient for gluten hydrolysis since NPE was able to hydrolyze both gliadins and glutenins.



**Fig. 5.** Degree of hydrolysis of gluten proteins by NPE after incubation at different times (0 - 240 min) at 37 °C. (A) Gliadins and (B) glutenins. Different concentration ratios were used between NPE proteins and gluten proteins (NPE protein: gliadin or glutenin). Different letters indicate a significant difference between the different ratios at 240 min ( $p < 0.05$ , Tukey's test).

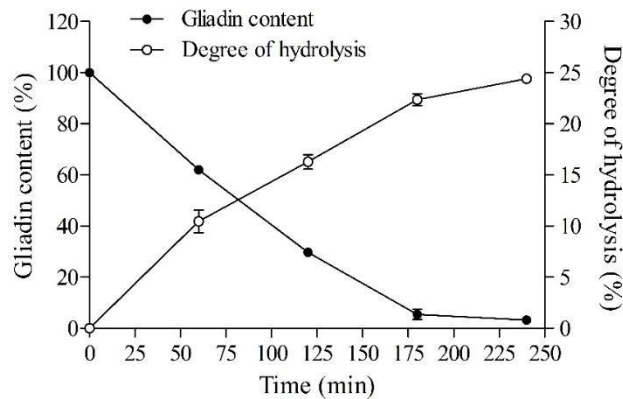
### 3.2 Gliadin content after hydrolysis by NPE

Gliadin is a significant wheat allergen, and the determination of their concentration in food is used as an indicator to assess the efficiency in reducing allergens by enzymatic treatment. Enzymatic hydrolysis is an efficient method to reduce food protein antigenicity.

Several studies have been conducted to use it in gluten detoxification before or after ingesting gluten-containing foods (Li *et al.*, 2016).

The enzyme immunoassay based on the Mendez R5 monoclonal antibody is a kit approved by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC International) for measuring gluten concentrations in food. These antibodies recognize small epitopes, QQPFP, LQPFP, QLPYP, QLPTP, QQSFP, QQTFF, PQQFP, QQPYP, and PQQFP, which repeatedly occur in prolamins and are potentially toxic to celiacs (Fuciños *et al.*, 2019).

The influence of the NPE and the DH on the total content of gliadin in hydrolysates is illustrated in Fig. 6. The initial gliadin concentration was determined based on the recognition of gliadins from non-hydrolyzed samples (control) and was drastically decreased with the increase in DH by NPE. The gliadin content was halved with a DH of approximately 13%, and it was reduced ( $p < 0.05$ ) almost wholly ( $96.80 \pm 0.10\%$ ) with a DH of 24.4% (ratio 1:1, 4 h).



**Fig. 6.** Residual gliadin content according to the degree of hydrolysis by NPE (0.2 mg/mL) at a ratio of 1:1 (NPE protein: gliadin), at different times at 37 °C.

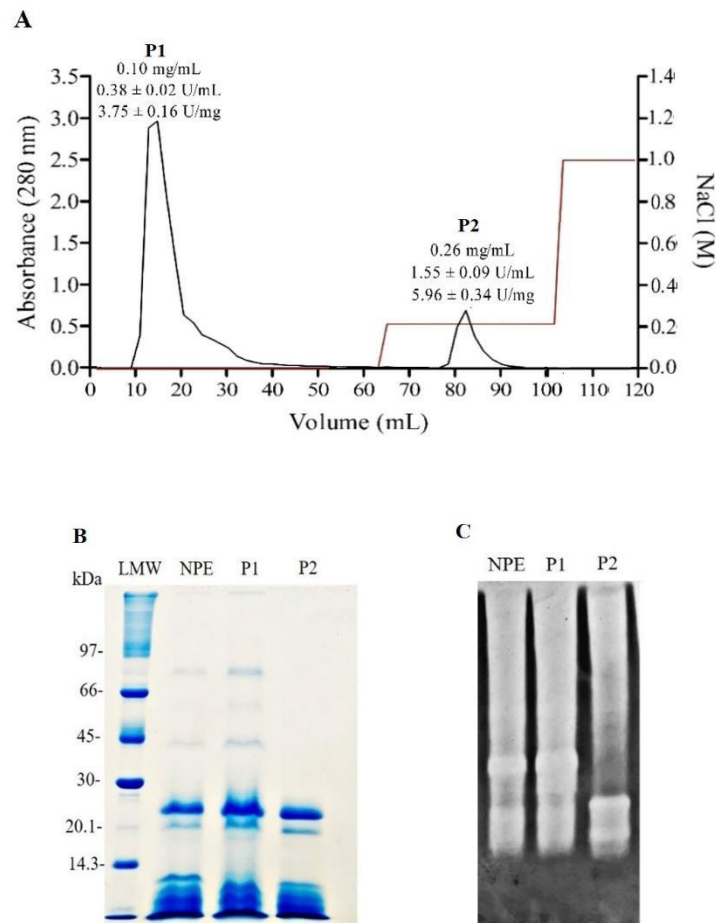
Other plant cysteine peptidases obtained from *Carica papaya*, *Actinidia deliciosa*, and *Triticum aestivum* have also shown the potential to decrease gliadin content. Caricain, when incorporated into bread dough (0.3 mg/g flour), reduced 97.5% of gliadin content after 5 h of

incubation (Buddrick *et al.*, 2015), and papain (254.30 U/g flour) showed a decrease in gliadin content of 94% after hydrolysis of wheat flour for 1 h (Li *et al.*, 2016). Mass spectrometry analysis revealed that actinidin (Jayawardana *et al.*, 2021) and triticain- $\alpha$  (Savvateeva *et al.*, 2015) could cleave at several sites of the 33-mer peptide from  $\alpha$ -gliadin, which is recognized as one of the most immunogenic peptides in gluten proteins. Overall, these results suggest that cysteine peptidases present in noni puree can decrease the immunogenicity of wheat gluten.

### *3.4 Detection of different peptidases of NPE involved in the hydrolysis of wheat gluten*

Previously it was observed that the proteolytic activity of NPE was completely inhibited in the presence of E-64 and iodoacetamide, cysteine peptidase inhibitors (Farias *et al.*, 2020). However, the presence of different NPE peptidases was not accessed in that investigation. Thus, in the present study, we fractionated NPE through a cation exchange chromatography to determine whether its proteolytic activity is related to one or different types of peptidases belonging to the same class.

Column elution profile of NPE presented a non-retained protein peak (P1) and a single retained protein peak (P2), eluted with 0.2 M NaCl. Both peaks showed proteolytic activity, with P2 displaying the highest proteolytic activity ( $1.55 \pm 0.09$  U/mL;  $5,96 \pm 0.34$  U/mg) compared to P1 ( $0.38 \pm 0.02$  U/mL;  $3.75 \pm 0.16$  U/mg) (Fig. 7A). Protein fractions with proteolytic activity at each peak were pooled for further studies. SDS-PAGE analysis showed similar protein patterns between P1 and P2. However, the zymography analysis showed two different peptidases with different molecular weights (Fig. 7 B – C).



**Fig. 7.** Biochemical fractionation of NPE peptidases. (A) Chromatographic profile of NPE on a Source 30S column. NPE (3 mL; 7.2 mg;  $18.22 \pm 1.56$  U/mL;  $7.59 \pm 0.65$  U/mg) was loaded onto a column previously equilibrated with 0.025 M sodium phosphate buffer (pH 6.0). The unretained proteins (P1) were eluted with the same equilibration buffer, and the retained proteins (P2) were eluted with 0.2 M NaCl prepared in 0.025 M sodium phosphate buffer (pH 6.0). Fractions of 2 mL were collected at a 60 mL/h flow rate. (B) SDS-PAGE (12.5%) (15  $\mu$ g in each well) and (C) zymogram (10% acrylamide + 0.1% gelatine) of the peaks obtained in ion-exchange chromatography (5.4  $\mu$ g in each well).

Peaks from ion-exchange chromatography (P1 and P2) were separately investigated in terms of the hydrolytic capacity of gliadins and glutenins. The hydrolysis of soluble gliadin and glutenins with NPE, P1, and P2 is shown in Fig. 8. Electrophoretic patterns indicated hydrolysis



of gliadins and glutenins with both P1 and P2. Gliadin hydrolysis was more extensive by P2 (Fig. 8A). On the contrary, P1 showed a more apparent decrease in glutenin bands than P2 (Fig. 8B).

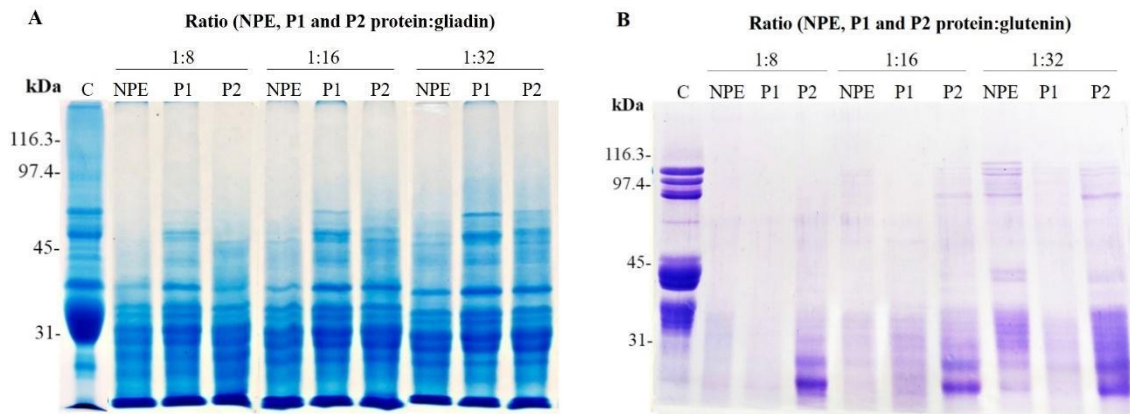
DH was determined after hydrolysis of a suspension of gliadins or glutenins with NPE, P1, and P2 in the ratio of 1:10. Both P1 and P2 achieved a similar ( $p < 0.05$ ) extent of gliadin hydrolysis after 60 min with a DH of 9.31% ( $\pm 0.80$ ) and 9.25% ( $\pm 0.37$ ), respectively, versus DH 7% ( $\pm 0.18$ ) of NPE (Fig 9A).

The result of glutenin hydrolysis was similar to that observed in SDS-PAGE analysis (Fig. 8B). After 60 min P1 had the highest ( $p < 0.05$ ) DH ( $10.68 \pm 0.04$  %), while P2 and NPE reached a DH of 8.55% ( $\pm 0.39$ ) and 4.74% ( $\pm 0.04$ ), respectively (Fig. 9B). Although P2 had a higher proteolytic activity, glutenins were more extensively hydrolyzed by P1. This indicates that although P1 and P2 peptidases have been able to hydrolyze gliadins and glutenins, they have different specificities.

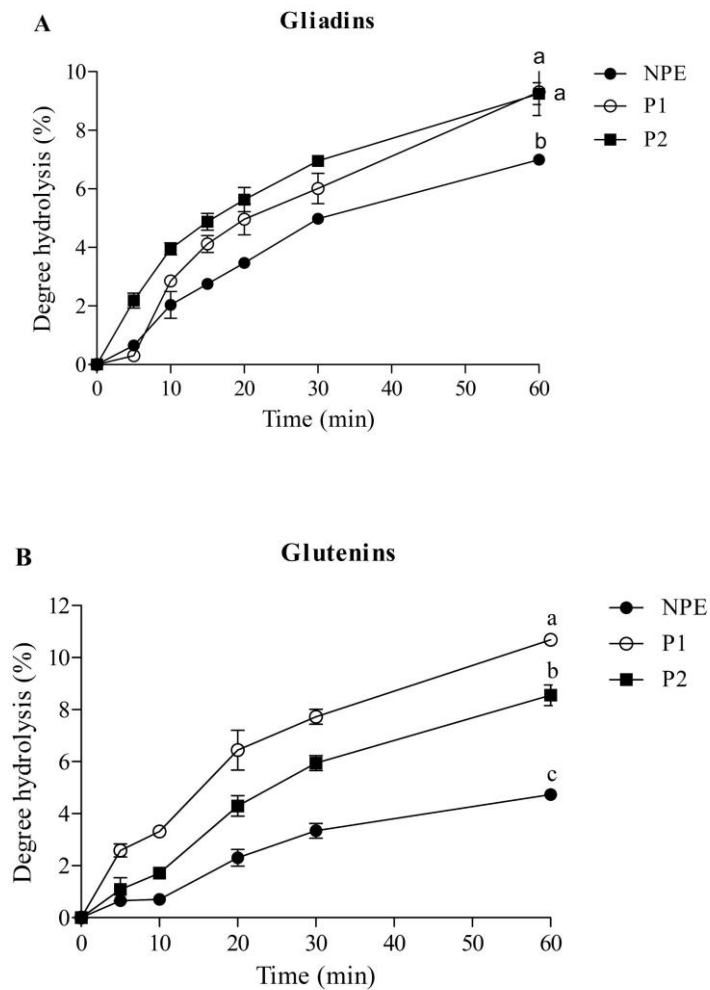
In the first test (SDS-PAGE), glutenins are soluble in the extraction solution, in which the reducing agent DTT is present. Although the electrophoretic pattern has shown that NPE, P1, and P2 decreased significantly more the intensity of glutenin bands than gliadins, data on the degree of hydrolysis point to a similar extent of hydrolysis between gliadin and glutenin. This is probably because glutenins form protein aggregates linked by interchain disulfide bonds. After reducing the disulfide bonds, the glutenin subunits present a solubility in aqueous alcohols, which possibly facilitated the access of the NPE peptidases and allowed more extensive hydrolysis (Wieser, 2007).

NPE showed two groups of peptidases with varying specificity but capable of hydrolyzing both gliadins and glutenins. The use of combined peptidases, a concept recently called combi-enzymes, may be an advantage for some applications, as the diversity of

selectivity and specificity allows the generation of a more significant amount of peptides and smaller sizes (Tacias-Pascacio *et al.*, 2020).



**Fig. 8.** SDS-PAGE (10%) of gluten proteins after hydrolysis by NPE. (A) Gliadins (8  $\mu$ g) and (B) glutenins (8  $\mu$ g) after hydrolysis for 60 min at 37  $^{\circ}$ C with NPE, P1, and P2 (peaks unretained and retained obtained in ion-exchange chromatography Source 30S, respectively). C, control (only gliadin or glutenin - 2 mg/mL).

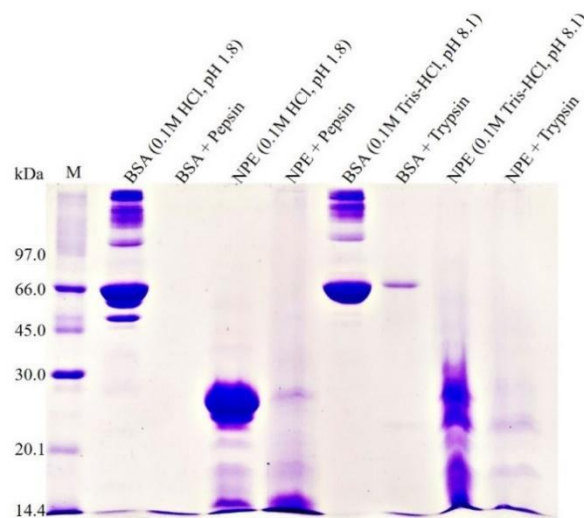


**Fig. 9.** Degree of hydrolysis of gluten proteins by proteolytic fractions of NPE. (A) Gliadins (2 mg/mL) and (B) glutenins (2 mg/mL) with 0.2 mg/mL NPE, peak non-retained (P1) and peak retained (P2) (ratio 1:10; NPE protein:gliadin or glutenin) after incubation at different times (0 - 60 min) at 37 °C. Different letters indicate a significant difference between NPE, P1, and P2 at 240 min ( $p < 0.05$ , Tukey's test).

### 3.5 *In vitro* digestion assay

The present study proposes the use of NPE as a food ingredient. Therefore, an essential piece of data to be analyzed is to verify whether NPE proteins are susceptible to human gastrointestinal enzymes. The simulated digestibility assay was performed by incubating NPE

with pepsin and trypsin at acidic or weakly alkaline pH, respectively, for 3 h. The activity of both enzymes was confirmed by their ability to hydrolyze bovine serum albumin (BSA). NPE proteins were almost entirely digested by pepsin and trypsin in the analyzed time interval, as can be seen in Fig. 10. This data represents evidence that NPE proteins may be present in foods to be consumed.



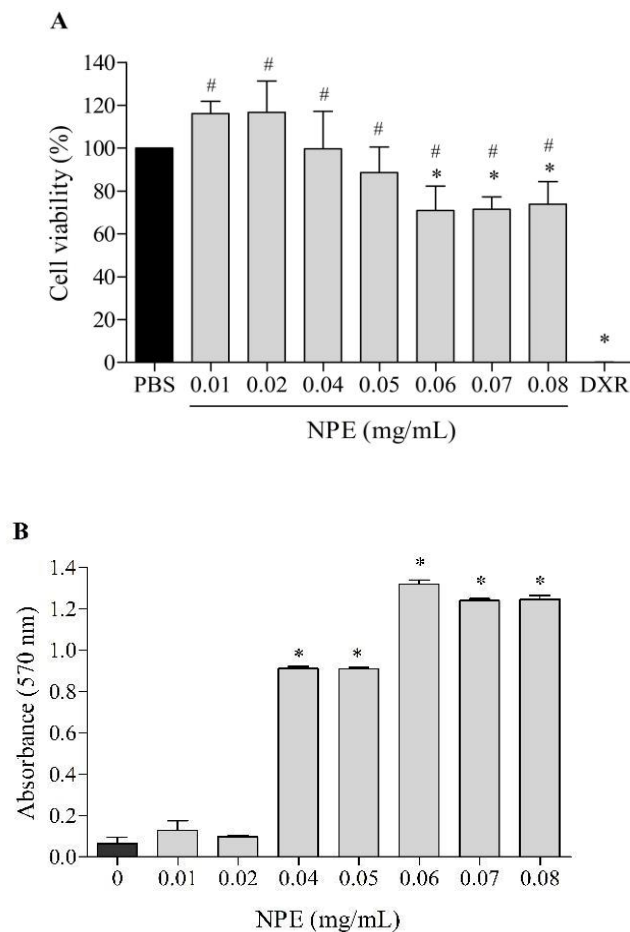
**Fig. 10.** SDS-PAGE (12.5%) profile of the in vitro digestibility of NPE (15  $\mu$ g) by pepsin and trypsin after 3 h. BSA (10  $\mu$ g) was used as a control. Protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. M, standard protein markers.

### 3.6 *In vitro* toxicity of NPE

The investigation of the influence of NPE on the cell metabolism of murine fibroblasts was carried out after 24 h of incubation. NPE did not show cytotoxicity at concentrations below 0.05 mg/mL. However, at higher concentrations, a decrease ( $p < 0.05$ ) of 29.11% ( $\pm 11.44$ ) of cell viability of murine fibroblasts (L929) (Fig. 11A) was observed. As expected, the chemotherapeutic agent doxorubicin, used as a positive control, induced cytotoxicity in cultured fibroblasts, decreasing cell viability by 100% ( $\pm 0.03$ ). Interestingly, it was observed that in wells with NPE concentration above 0.05 mg/mL, the cells presented a spherical structure different from the elongated structure typical of fibroblasts (data not shown). This commonly

occurs when these cells are detached from the substrate. NPE is rich in peptidases, and proteins from this group are routinely used in enzymatic dissociations of cell cultures to break the extracellular matrix and, thus, obtain individualized cells to transfer the cultures to a new substrate. The most used nonspecific proteolytic enzyme for this purpose is trypsin (Patil *et al.*, 2020). Thus, NPE may have hydrolyzed extracellular matrix proteins of fibroblasts, preventing these cells from attaching to the substrate. Since the fibroblasts were in suspension, they were discarded together with the supernatant during the replacement of the culture medium. To confirm this hypothesis, the fibroblasts exposed to NPE were washed with PBS, and then the MTT assay was performed again.

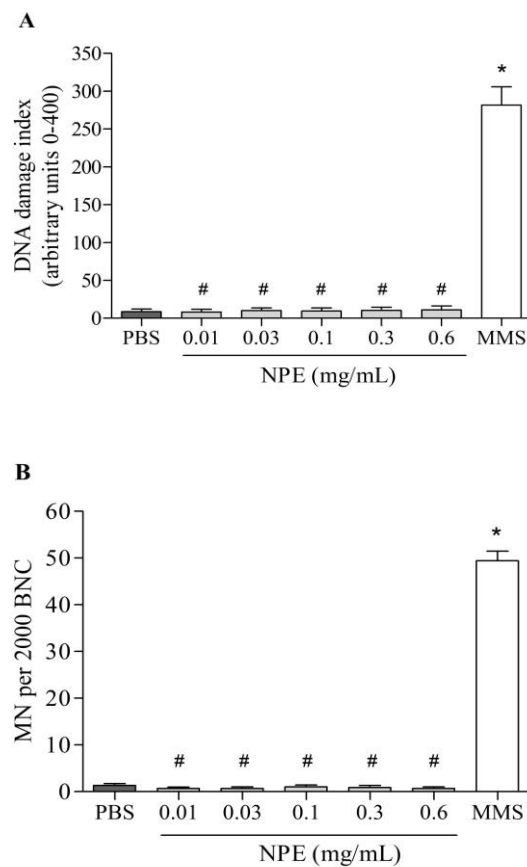
Fig. 11B shows that the supernatant from the wells containing 0.04-0.08 mg/mL NPE had more cells. It is noteworthy that although NPE cleaved proteins from the extracellular matrix of fibroblasts, there was no cell lysis even after contact for 24 hours. The decrease in cell viability (Fig. 11A) was due to fewer cells present in the well than the negative control (PBS). As mentioned earlier, NPE-treated cells did not attach to the bottom of the well and were discarded during culture medium replacement. Another study showed that noni fruit purees were not toxic against HepG2 cells at 0.15 mg/mL (West *et al.*, 2009).



**Fig. 11.** (A) Effect of NPE on the cell viability of murine fibroblasts (L929) through the absorbance of the formazan compound (MTT assay). (B) Absorbance of supernatant from murine fibroblast culture after 24 h incubation with 0.01-0.08 mg/mL NPE (MTT assay). Negative control was treated with PBS and was considered to be 100% of cell viability. Positive control was treated with  $5 \times 10^{-3}$  mg/mL doxorubicin (DXR). Asterisks indicate a difference ( $p < 0.05$ ) to the negative control (Tukey test). Hashtags indicate a difference ( $p < 0.05$ ) when compared to the positive control (Tukey test).

The study on the effect of NPE on DNA damage was carried out through the comet and micronucleus tests. While the comet test can detect repairable single- and double-stranded DNA breaks, the micronucleus test allows for the quantification of additional nuclei formed from chromosomes or chromosome fragments separated from the central nucleus during mitosis (Wolff *et al.*, 2019). Mutations during cell division can result in several genetic diseases as they

may be involved in oncogenesis processes, suppression, or defective gene production (Fenech, 2000). NPE (0.01-0.6 mg/mL) could not induce DNA strand breaks (Fig. 12A) and micronucleus formation (Fig. 12B) after 24 h of treatment, similar ( $p < 0.05$ ) to the control group. However, the alkylating agent methyl methanesulfonate (MMS) exhibited severe DNA damage (Fig. 12A) and produced significant chromosomal alterations (Fig. 12B) in murine fibroblasts. Thus, given the data presented, NPE is unlikely to cause any genotoxic effects.



**Fig. 12.** Effect of NPE on the (A) DNA damage index and the (B) frequency of micronucleated cells in murine fibroblast (L929) after exposure for 24 h. Negative control was treated with PBS, and  $4.4 \times 10^{-3}$  mg/mL MMS (methyl methanesulfonate) was used as a positive control. Asterisks indicate a difference ( $p < 0.05$ ) compared to the negative control (Tukey test). Hashtags show a difference ( $p < 0.05$ ) concerning the positive control (Tukey test). MN, micronucleus; BNC, binucleated cells.

### 3.7 *In vivo* toxicity of NPE

In vitro toxicity studies alone cannot be used as conclusive evidence that an agent is non-toxic. For this reason, the present study also evaluates the possible toxic effects of NPE by single or repeated doses administration in mice.

The doses of NPE (mg/kg) utilized in this study were determined based on the amount of NPE used for artisanal cheese production, as described by Farias *et al.*, 2020. Cheeses made using NPE as a coagulant followed the proportion of 150 mg of NPE for each kilogram of cheese. If a 60 kg adult consumed one kilogram of cheese per day, the dose of NPE ingested would be 2.5 mg/kg. Based on these data and aiming at applying NPE for the production of other foods, we decided to test higher doses.

The acute toxicity study was conducted to assess the toxic effects after single or short-term exposure to NPE. The animals were monitored for 14 consecutive days after dosing once with NPE (80 or 160 mg/kg). After the observation period, none of the mice showed any toxic signs or died. No significant changes ( $p < 0.05$ ) were observed in all groups over 14 days concerning the mass body gain. All the animals' feed intake (g/day/animal) was similar ( $p > 0.05$ ) between the control and the treated groups (data not shown). The general appearance, posture, gait, behavior, and other observational parameters were normal during the study. The macroscopy did not demonstrate any visible changes in the organs of the mice treated once with NPE (80 or 160 mg/kg).

In the repeated dose 28-day toxicity study, it is possible to assess the safety of a substance in an organism after continuous exposure over a period of time. The use of NPE as a food ingredient predicts its continued consumption, even daily, which makes this test essential. During the study, no deaths and no clinical changes were observed in the control and NPE (5, 10, or 20 mg/kg/day) treated groups. At the end of 28 days, the variations observed in body weights were also similar ( $p > 0.05$ ) between the control and NPE (5, 10, or 20 mg/kg/day) treated groups.



The measurement of body weight is considered a sensitive index for evaluating the chemical toxicity of compounds. Feed intake (g/day/animal) of male animals was lower ( $p < 0.05$ ) in the groups administered with 5 or 20 mg/kg/day of NPE ( $3.30 \pm 0.26$  g and  $3.09 \pm 0.17$  g, respectively) compared to the control group ( $3.74 \pm 0.07$  g). In females, only the 10 mg/kg/day NPE group had significantly lower feed intake ( $p < 0.05$ ) compared to the control group ( $2.62 \pm 0.23$  g and  $3.11 \pm 0.11$  g, respectively). Based on the results obtained, it could be observed that there was no correlation between feed intake and mass body gain between the control and NPE-treated groups.

The hematological and biochemical parameters are essential aspects to be analyzed in assessing toxicity. These are efficient indicators of damage from organ dysfunction and have a high predictive value for toxicity in humans. (Wolff *et al.*, 2019). Data obtained from hematology and serum biochemical analyses are presented in Tables 1 and 2, respectively. In hematology analysis, males demonstrated a decrease ( $p < 0.05$ ) in differential LYM in the 20 mg/kg/day NPE group and in the differential PCT in the 5 and 10 mg/kg/day NPE compared to the control group. A significant increase ( $p < 0.05$ ) in differential GRA was also observed in the 20 mg/kg/day NPE group, in GRA count in the 5 mg/kg/day NPE group, and in MCHC in the 5 and 10 mg/kg/day NPE group, compared to the control group. In females, a significant increase ( $p < 0.05$ ) in differential GRA and a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in differential LYM and PLT were observed only in the 10 mg/kg/day NPE group. In the 20 mg/kg/day NPE group, there was a significant decrease in PDW compared to the control group. As observed for the results obtained for feed intake and body mass variation of mice, there was no correlation between the doses of NPE administered and the hematological alterations reported.

In serum biochemistry analysis, males showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the levels of glucose, cholesterol, and AST, and a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in the creatinine level at the dose of 5 mg/kg/day of NPE compared to the control group. In the 10 mg/kg/day

NPE group, there was a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in the uric acid level compared to the control group.

Females also showed significant alterations in groups treated with 5 and 10 mg/kg/day of NPE. An increase ( $p < 0.05$ ) was observed in albumin, uric acid, and urea in the 10 mg/kg/day NPE group. There was also a significant increase in the 5 mg/kg/day and 10 mg/kg/day NPE groups regarding the creatinine level. A significant decrease ( $p < 0.05$ ) in ALT level was observed in the 10 mg/kg/day NPE group compared to the control group. Compared to the control, no change in biochemical parameters was shown by males and females of the higher dose groups (20 mg/kg/day NPE). Differences in biochemical parameters were not associated with the administration of NPE since there was no dose-dependent relationship.

**Table 1.** Hematology results of mice orally treated with NPE (5, 10, and 20 mg/kg/day) for 28 days.

	Control	NPE (mg/kg)		
		5	10	20
<b>Male</b>				
WBC ( $10^9/L$ )	2.72 ± 0.70	2.69 ± 0.55	2.86 ± 0.07	3.03 ± 0.31
LYM ( $10^9/L$ )	2.43 ± 0.56	2.31 ± 0.49	1.79 ± 0.54	2.43 ± 0.18
GRA ( $10^9/L$ )	0.20 ± 0.09	0.50 ± 0.18*	0.31 ± 0.06	0.33 ± 0.06
LYM (%)	90.76 ± 2.59	86.20 ± 6.50	86.88 ± 4.24	79.46 ± 6.60*
GRA (%)	6.83 ± 1.03	10.10 ± 2.23	9.53 ± 2.97	17.58 ± 6.65*
RBC ( $10^{12}/L$ )	7.91 ± 0.61	8.02 ± 0.64	7.32 ± 0.27	8.12 ± 0.74
HGB (g/dl)	11.98 ± 0.85	12.71 ± 0.87	11.80 ± 0.20	12.16 ± 1.13
HCT (%)	41.30 ± 3.49	40.28 ± 2.36	37.36 ± 1.77	40.85 ± 3.72
MCV (fl)	52.20 ± 1.64	50.33 ± 2.25	50.60 ± 1.52	50.33 ± 1.03
MCH (pg)	15.16 ± 0.68	15.88 ± 0.99	15.84 ± 0.84	14.96 ± 0.40
MCHC (g/dl)	29.04 ± 1.19	31.60 ± 1.48*	31.26 ± 1.24*	29.73 ± 0.37
RDW (%)	15.00 ± 0.95	14.26 ± 0.47	15.02 ± 0.94	14.51 ± 0.43
PLT ( $10^9/L$ )	1,162.00 ± 451.80	928.40 ± 57.39	1,199.66 ± 180.14	1,258.40 ± 227.53
PCT (%)	0.98 ± 0.31	0.58 ± 0.05*	0.56 ± 0.11*	0.74 ± 0.09
MPV (fl)	5.80 ± 0.51	5.96 ± 0.35	5.82 ± 0.44	5.66 ± 1.04
PDWc (%)	30.72 ± 2.41	30.93 ± 0.97	30.34 ± 1.44	30.00 ± 4.35
<b>Female</b>				
WBC ( $10^9/L$ )	3.63 ± 0.85	3.14 ± 0.91	2.84 ± 0.43	3.53 ± 0.79
LYM ( $10^9/L$ )	3.21 ± 0.66	2.78 ± 0.61	2.18 ± 0.21*	3.14 ± 0.69
GRA ( $10^9/L$ )	0.4 ± 0.12	0.35 ± 0.05	0.55 ± 0.27	0.28 ± 0.06

LYM (%)	88.96 ± 4.96	82.88 ± 8.53	82.06 ± 10.30	88.74 ± 2.17
GRA (%)	9.40 ± 2.08	13.53 ± 4.96	20.66 ± 4.48*	8.12 ± 1.79
RBC (10 <sup>12</sup> /L)	8.13 ± 1.07	7.87 ± 0.71	7.69 ± 1.27	8.19 ± 0.62
HGB (g/dl)	12.68 ± 1.24	12.41 ± 1.13	11.92 ± 2.24	12.72 ± 0.79
HCT (%)	41.86 ± 4.64	40.36 ± 3.39	38.85 ± 6.46	43.62 ± 2.46
MCV (fl)	51.60 ± 2.70	51.33 ± 1.97	50.60 ± 0.55	53.20 ± 2.59
MCH (pg)	15.66 ± 0.63	15.76 ± 0.64	15.36 ± 0.42	15.54 ± 0.47
MCHC (g/dl)	30.34 ± 1.39	30.76 ± 0.65	30.40 ± 0.86	29.14 ± 1.14
RDWc (%)	15.72 ± 0.44	15.40 ± 0.49	14.02 ± 0.61	15.68 ± 1.94
PLT (10 <sup>9</sup> /L)	1,156.25 ± 247.18	1,153.25 ± 226.95	717.66 ± 213.88*	1,401.00 ± 366.25
PCT (%)	0.72 ± 0.15	0.63 ± 0.11	0.35 ± 0.13*	0.94 ± 0.23
MPV (fl)	6.08 ± 0.57	5.53 ± 0.24	5.46 ± 0.15	5.82 ± 0.59
PDW (%)	32.36 ± 2.10	29.93 ± 1.94	30.24 ± 0.95	27.90 ± 2.95*

Data are expressed as mean ± SD. n=6/sex/group.

Asterisk indicates values that were different ( $p < 0.05$ ) from the respective control (saline 0.9%).

WBC, white blood cells; LYM, lymphocytes; GRA, granulocytes; RBC, red blood cells; HGB, hemoglobin; HCT, hematocrit; MCV, mean cell volume; MCH, mean cell hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW, red cell distribution width; PLT, platelet; PCT, plateletcrit; MPV, mean platelet volume; PDW, platelet distribution width.

**Table 2.** Serum biochemistry results of mice orally treated with NPE (5, 10, and 20 mg/kg/day) for 28 days.

	Control	NPE (mg/kg)		
		5	10	20
<b>Male</b>				
Glucose (mg/dL)	163.49 ± 31.62	246.16 ± 51.60*	245.08 ± 30.12*	225.00 ± 39.95
Cholesterol (mg/dL)	118.19 ± 21.48	164.77 ± 29.19*	143.72 ± 9.59	136.13 ± 26.74
Total protein (g/dL)	4.70 ± 0.55	4.96 ± 0.29	4.34 ± 0.07	4.56 ± 0.87
Albumin (g/dL)	1.74 ± 0.33	1.63 ± 0.10	1.69 ± 0.09	1.46 ± 0.30
Uric acid (mg/dL)	2.15 ± 0.39	2.36 ± 0.22	1.52 ± 0.33*	2.01 ± 0.03
Urea (mg/dL)	58.97 ± 4.55	48.97 ± 6.85	53.53 ± 7.18	55.44 ± 8.74
Creatinine (mg/dL)	0.36 ± 0.08	0.16 ± 0.07*	0.42 ± 0.07	0.35 ± 0.06
ALP (U/L)	49.75 ± 8.81	54.36 ± 2.11	47.22 ± 6.45	52.75 ± 5.89
ALT (U/L)	42.03 ± 8.57	52.88 ± 6.29	43.78 ± 7.41	53.57 ± 12.13
AST (U/L)	90.58 ± 18.97	131.30 ± 14.07*	67.63 ± 11.79	69.21 ± 15.20
<b>Female</b>				
Glucose (mg/dL)	230.11 ± 47.49	212.36 ± 39.85	193.75 ± 30.51	197.73 ± 31.63
Cholesterol (mg/dL)	113.61 ± 12.65	103.27 ± 18.89	116.68 ± 17.58	100.50 ± 17.95
Total protein (g/dL)	4.00 ± 0.60	4.56 ± 0.08	4.71 ± 0.53	3.98 ± 0.43

Albumin (g/dL)	1.49 ± 0.26	1.74 ± 0.08	1.78 ± 0.14*	1.37 ± 0.16
Uric acid (mg/dL)	1.69 ± 0.32	1.40 ± 0.25	2.58 ± 0.19*	1.45 ± 0.11
Urea (mg/dL)	44.47 ± 4.61	52.28 ± 4.80	57.94 ± 4.86*	52.35 ± 9.68
Creatinine (mg/dL)	0.39 ± 0.08	0.52 ± 0.09*	0.55 ± 0.05*	0.36 ± 0.06
ALP (U/L)	44.22 ± 7.90	55.28 ± 9.22	54.59 ± 9.93	52.86 ± 7.43
ALT (U/L)	53.57 ± 7.33	52.54 ± 9.29	37.91 ± 5.94*	42.75 ± 8.31
AST (U/L)	72.46 ± 9.71	74.78 ± 19.27	81.29 ± 14.66	64.10 ± 3.94

Data are expressed as mean ± SD. n=6/sex/group.

Asterisk indicates values that were different ( $p < 0.05$ ) from the respective control (saline 0.9%).

ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase.

The macroscopy revealed no sign of swelling, atrophy, or hypertrophy in the organs of mice. As presented in Table 3, the relative organ weights were significantly ( $p < 0.05$ ) different for small intestine and thymus in males and lungs in females, only in the 20 mg/kg/day NPE group, compared to the control group. Other significant differences observed in the 5 or 10 mg/kg/day NPE groups were not associated with the administration of NPE since there was no dose-response relationship. It is essential to mention that, although changes in the relative weight of organs provide a valuable sign that may indicate target organ hypertrophy or necrosis (Teo *et al.*, 2002), these data should be evaluated in an integrated manner with anatomopathological, biochemical, and histopathological findings.

In general, male and female mice treated with 20 mg/kg/day NPE for 28 days showed no histopathological lesions in the examined organs. The liver and kidney are the two most essential organs in metabolism and excretion. No morphological alterations occurred in the kidney of both male and female mice groups treated with 20 mg/kg/day NPE. This data agrees with those serum levels of urea and creatinine, which presented no differences ( $p < 0.05$ ) compared to the control. Increasing urea levels indicate tissue injuries, such as renal

parenchymal and calculi, whereas elevated creatinine levels suggest impaired glomerular filtration (Christapher *et al.*, 2017).

The liver of animals from control and 20 mg/kg/day NPE groups showed centrilobular vein congestion and hepatocytes with mild cell swelling. Serum levels of ALT, AST, and ALP of the analyzed groups agree with healthy animals from other reported data (Sun *et al.*, 2021; Gao *et al.*, 2019). The transaminases ALT, AST, and ALP have a wide distribution in animal tissues, although their enzymatic activity is higher in the liver. Therefore, increases in serum levels of these enzymes indicate damage to liver function (Sun *et al.*, 2021). Other histopathological findings were not considered toxicological relevance, as they occurred at a similar frequency in control and treated-NPE groups. Corroborating with the results presented above, previous studies have shown that treating rats with 6.86 g/kg of dry noni pulp (West *et al.*, 2009) and 5 g/kg of dry whole fruit (Rosly *et al.*, 2011) did not result in histopathological changes.

This study showed that gastrointestinal enzymes digested NPE proteins suggesting this group of molecules is inactivated after oral administration. This data could explain at least in part the absence of toxicity of mice after the treatment with repeated doses of NPE.

It is relevant to point out that noni juice has been approved as a new food ingredient by the European Union due to the lack of convincing evidence about the toxicity of noni juice (European Food Safety Authority, 2003, 2006). Moreover, noni fruits have a long history of consumption of more than 2000 years by Polynesians (Abou Assi *et al.*, 2017). Based on the results obtained in this work, we assume that noni puree can be considered safe as a food ingredient.

**Table 3.** Relative weight of fresh organs of mice orally treated with NPE (20 mg/kg) for 28 days.

	Control	NPE (mg/kg)		
		5	10	20
<b>Males</b>				
Small intestine	0.036 ± 0.002	0.040 ± 0.006	0.044 ± 0.003*	0.044 ± 0.005*
Pancreas	0.009 ± 0.001	0.008 ± 0.003	0.007 ± 0.001	0.008 ± 0.001
Stomach	0.007 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.000	0.008 ± 0.001
Thymus	0.001 ± 0.000	0.002 ± 0.000*	0.002 ± 0.001*	0.002 ± 0.000*
Liver	0.044 ± 0.003	0.044 ± 0.004	0.046 ± 0.002	0.045 ± 0.004
Heart	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.000
Kidneys	0.014 ± 0.001	0.014 ± 0.001	0.014 ± 0.001	0.013 ± 0.001
Spleen	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001
Lung	0.004 ± 0.000	0.005 ± 0.001	0.006 ± 0.001*	0.005 ± 0.001
<b>Females</b>				
Small intestine	0.042 ± 0.002	0.054 ± 0.010*	0.045 ± 0.008	0.050 ± 0.004
Pancreas	0.009 ± 0.002	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.009 ± 0.001
Stomach	0.009 ± 0.000	0.010 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.001
Thymus	0.002 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.000	0.002 ± 0.000
Liver	0.046 ± 0.003	0.048 ± 0.002	0.045 ± 0.002	0.042 ± 0.003
Heart	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.000
Kidneys	0.013 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.013 ± 0.001
Spleen	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.000	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.000
Lung	0.005 ± 0.000	0.006 ± 0.000*	0.006 ± 0.001*	0.006 ± 0.001*

Data are expressed as mean ± SD. n=6/sex/group.

Asterisk indicates values that were different ( $p < 0.05$ ) from the respective control (saline 0.9%).

#### 4 Conclusion

Noni puree has proven to be an interesting ingredient for the food industry. Cysteine peptidases from NPE have already been used for cheese production, and in this work, they proved that they are also capable of hydrolyzing gluten proteins. Peptides from hydrolyzed gliadins had low detection by the R5 ELISA, making NPE a candidate for gluten detoxification. However, studies on the investigation of cleavage sites and optimizations for the hydrolysis of whole wheat flour are still needed. The results obtained in this study contributed to gathering

relevant data on the food safety of noni puree. NPE did not show cytotoxic and genotoxic effects on murine fibroblasts. In single-dose and repeated-dose 28-day trials with mice, NPE consumption also did not induce changes indicative of toxicity. These findings corroborate previous studies and point to the food safety of noni puree, which makes its use as a food ingredient viable.

### **Conflict of interest statement**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### **Acknowledgment**

The authors would like to thank the Brazilian institution's CAPES (Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education), CNPq (National Council for Scientific and Technological Development), and UFC (Federal University of Ceará), for the physical installation and financial support of this research.

### **References**

- Abou Assi, R., Darwis, Y., Abdulbaqi, I.M., Khan, A.A., Vuanghao, L., Laghari, M.H., 2017. *Morinda citrifolia* (Noni): A comprehensive review on its industrial uses, pharmacological activities, and clinical trials. *Arab. J. Chem.* 10, 691–707. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.06.018>
- Bozkurt, F., Bekiroglu, H., Dogan, K., Karasu, S., Sagdic, O., 2021. Technological and Bioactive Properties of Wheat Glutenin Hydrolysates Prepared with Various Commercial Peptidases. *LWT - Food Sci. Technol.* 111787. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111787>
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72,

248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Buddrick, O., Cornell, H.J., Small, D.M., 2015. Reduction of toxic gliadin content of wholegrain bread by the enzyme caricain. *Food Chem.* 170, 343–347. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.030>

Christapher, P.V., Parasuraman, S., Asmawi, M.Z., Murugaiyah, V., 2017. Acute and subchronic toxicity studies of methanol extract of *Polygonum minus* leaves in Sprague Dawley rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 86, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.02.005>

Collins, A.R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 26, 249–261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>

Damerval, C., De Vienne, D., Zivy, M., Thiellement, H., 1986. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 7, 52–54. <https://doi.org/10.1002/elps.1150070108>

European Commission, 2003. 2003/426/EC: commission decision of 5 June 2003 authorizing the placing on the market of “noni juice” (juice of the fruit of *Morinda citrifolia* L.) as a novel food ingredient under regulation (EC)No 258/97 of the European Parliament and of the council. *Official J Eur. Union L* 144, 12/06/2003. p 0012-0012. [FAO/WHO] Food.

European Food Safety Authority, 2006. Opinion on a request from the Commission related to the safety of noni juice (juice of the fruits of *Morinda citrifolia*). *EFSA J.* 376, 1-12.

Farias, V.A., Lima, A.D.R., Costa, A.S., Freitas, C.D.T., Araújo, M.I.S., Garruti, D.S., Figueiredo, E.A.T., Oliveira, H.D., 2020. Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit as a new source of milk-clotting cysteine peptidases. *Food Res. Int.* 127, 108689. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108689>



- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455, 81–95.  
[https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)
- Freitas, C.D.T., Oliveira, J.S., Miranda, M.R.A., Macedo, N.M.R., Sales, M.P., Villas-Boas, L.A., Ramos, M.V., 2007. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. *Plant Physiol. Biochem.* 45, 781–789.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.07.020>
- Fuciños, C., Estévez, N., Míguez, M., Fajardo, P., Chapela, M.J., Gondar, D., Rúa, M.L., 2019. Effectiveness of proteolytic enzymes to remove gluten residues and feasibility of incorporating them into cleaning products for industrial purposes. *Food Res. Int.* 120, 167–177. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.037>
- Gao, Y., Wang, T., Wang, G., Li, G., Sun, C., Jiang, Z., Yang, J., Li, Y., You, Y., Wu, X., Sun, L., Wang, H., Li, C., Tian, J., Zhu, J., Wang, K., Cho, S., 2019. Preclinical safety of ginsenoside compound K: Acute, and 26-week oral toxicity studies in mice and rats. *Food Chem. Toxicol.* 131, 110578. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110578>
- Jayawardana, I.A., Boland, M.J., Higgs, K., Zou, M., Loo, T., McNabb, W.C., Montoya, C.A., 2021. The kiwifruit enzyme actinidin enhances the hydrolysis of gluten proteins during simulated gastrointestinal digestion. *Food Chem.* 341, 128239.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128239>
- Krishnareddy, S., Stier, K., Recanati, M., Lebwohl, B., Green, P.H., 2017. Commercially available glutenases: a potential hazard in coeliac disease. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 10, 273–281. <https://doi.org/10.1177/1756283X17690991>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Li, Y., Yu, J., Goktepe, I., Ahmedna, M., 2016. The potential of papain and alcalase enzymes and process optimizations to reduce allergenic gliadins in wheat flour. *Food Chem.* 196,

1338–1345. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.089>

- Merz, M., Kettner, L., Langolf, E., Appel, D., Blank, I., Stressler, T., Fischer, L., 2016. Production of wheat gluten hydrolysates with reduced antigenicity employing enzymatic hydrolysis combined with downstream unit operations. *J. Sci. Food Agric.* 96, 3358–3364. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7515>
- Mosmann, T., 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Nielsen, P.M., Petersen, D., Dambmann, C., 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J. Food Sci.* 66, 642–646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x>
- OECD Guideline for testing of chemicals 2001. Acute Oral Toxicity: – Acute Toxic Class Method. Test No. 423. OECD, Publishing
- OECD Guideline for testing of chemicals, 2008. Repeated Dose 28-day Oral Toxicity in Rodents, Test No. 407. OECD, Paris.
- Patil, R., Kale, A.D., Mane, D.R., Patil, D., 2020. Isolation, culture and characterization of primary cell lines of human buccal mucosal fibroblasts: A combination of explant enzymatic technique. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 24, 68–75. <https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP>
- Rosly, S.M., Shanmugavelu, S., Murugaiyah, M., Hadijah, H., Ahmad Tarmizi, S., Noridayusni, Y., Subramaniam, K., 2011. Subchronic oral toxicity study of *Morinda citrifolia* (Mengkudu) in sprague dawley rats. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 34, 341–349.
- Sathe, S.K., 1993. Solubilization, Electrophoretic Characterization and in Vitro Digestibility of Almond (*Prunus Amygdalus*) Proteins. *J. Food Biochem.* 16, 249–264. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1992.tb00450.x>

- Savvateeva, L. V., Gorokhovets, N. V., Makarov, V.A., Serebryakova, M. V., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y., Reddy, V.P., Zernii, E.Y., Zamyatnin, A.A., Aliev, G., 2015. Glutenase and collagenase activities of wheat cysteine peptidase Triticain- $\alpha$ : Feasibility for enzymatic therapy assays. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 62, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.03.001>
- Scherf, K.A., Wieser, H., Koehler, P., 2018. Novel approaches for enzymatic gluten degradation to create high-quality gluten-free products. *Food Res. Int.* 110, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.021>
- Singh, N.K., Shepherd, K.W., Cornish, G.B., 1991. A simplified SDS—PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *J. Cereal Sci.* 14, 203–208. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(09\)80039-8](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(09)80039-8)
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Sun, P.P., Lai, C.S., Hung, C.J., Dhaiveegan, P., Tsai, M.L., Chiu, C.L., Fang, J.M., 2021. Subchronic oral toxicity evaluation of gold nanoparticles in male and female mice. *Heliyon* 7, e06577. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06577>
- Tacias-Pascacio, V.G., Morellon-Sterling, R., Siar, E.H., Tavano, O., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R., 2020. Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 165, 2143–2196. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.060>
- Tavano, O.L., Berenguer-Murcia, A., Secundo, F., Fernandez-Lafuente, R., 2018. Biotechnological Applications of Peptidases in Food Technology. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17, 412–436. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12326>
- Teo, S., Stirling, D., Thomas, S., Hoberman, A., Kiorpes, A., Khetani, V., 2002. A 90-day oral

gavage toxicity study of D-methylphenidate and D,L-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 179, 183–196. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00338-4](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00338-4)

Villemin, C., Tranquet, O., Solé-Jamault, V., Smit, J.J., Pieters, R.H.H., Denery-Papini, S., Bouchaud, G., 2020. Deamidation and Enzymatic Hydrolysis of Gliadins Alter Their Processing by Dendritic Cells in Vitro. *J. Agric. Food Chem.* 68, 1447–1456. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06075>

Wang, M.Y., Nowicki, D., Anderson, G., Jensen, J., West, B., 2008. Liver protective effects of *Morinda citrifolia* (Noni). *Plant Foods Hum. Nutr.* 63, 59–63. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0070-3>

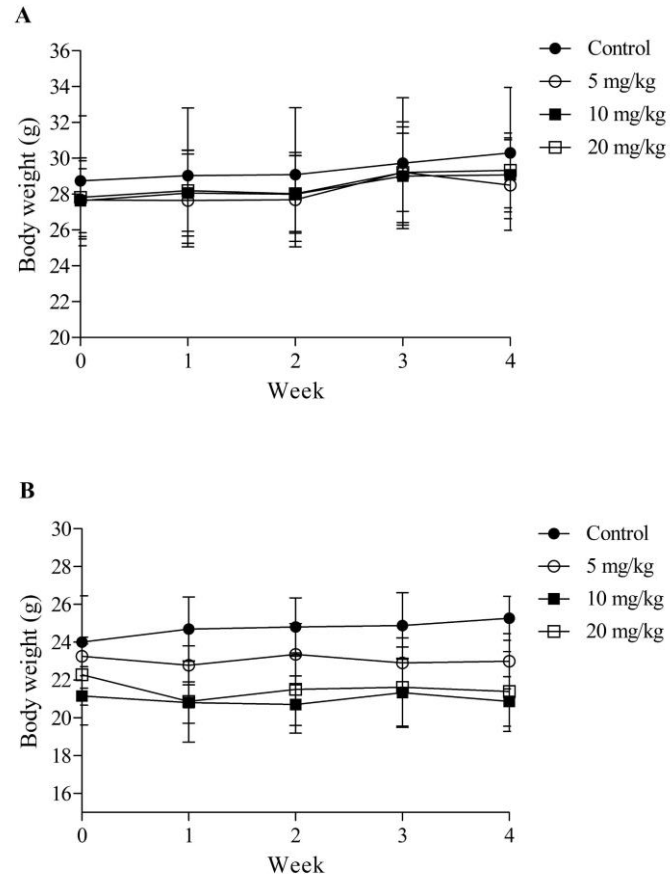
Wei, G., Helmerhorst, E.J., Darwish, G., Blumenkranz, G., Schuppan, D., 2020. Gluten degrading enzymes for treatment of celiac disease. *Nutrients* 12, 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu12072095>

West, B.J., Su, C.X., Jensen, C.J., 2009. Hepatotoxicity and subchronic toxicity tests of *Morinda citrifolia* (noni) fruit. *J. Toxicol. Sci.* 34, 581–585. <https://doi.org/10.2131/jts.34.581>

Wieser, H., 2007. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* 24, 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.004>

Wolff, F.R., Broering, M.F., Jurcevic, J.D., Zermiani, T., Bramorski, A., Vitorino, J.C., Malheiros, A., Santin, J.R., 2019. Safety assessment of *Piper cernuum* Vell. (Piperaceae) leaves extract: Acute, sub-acute toxicity and genotoxicity studies. *J. Ethnopharmacol.* 230, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.10.035>

## Supplementary data

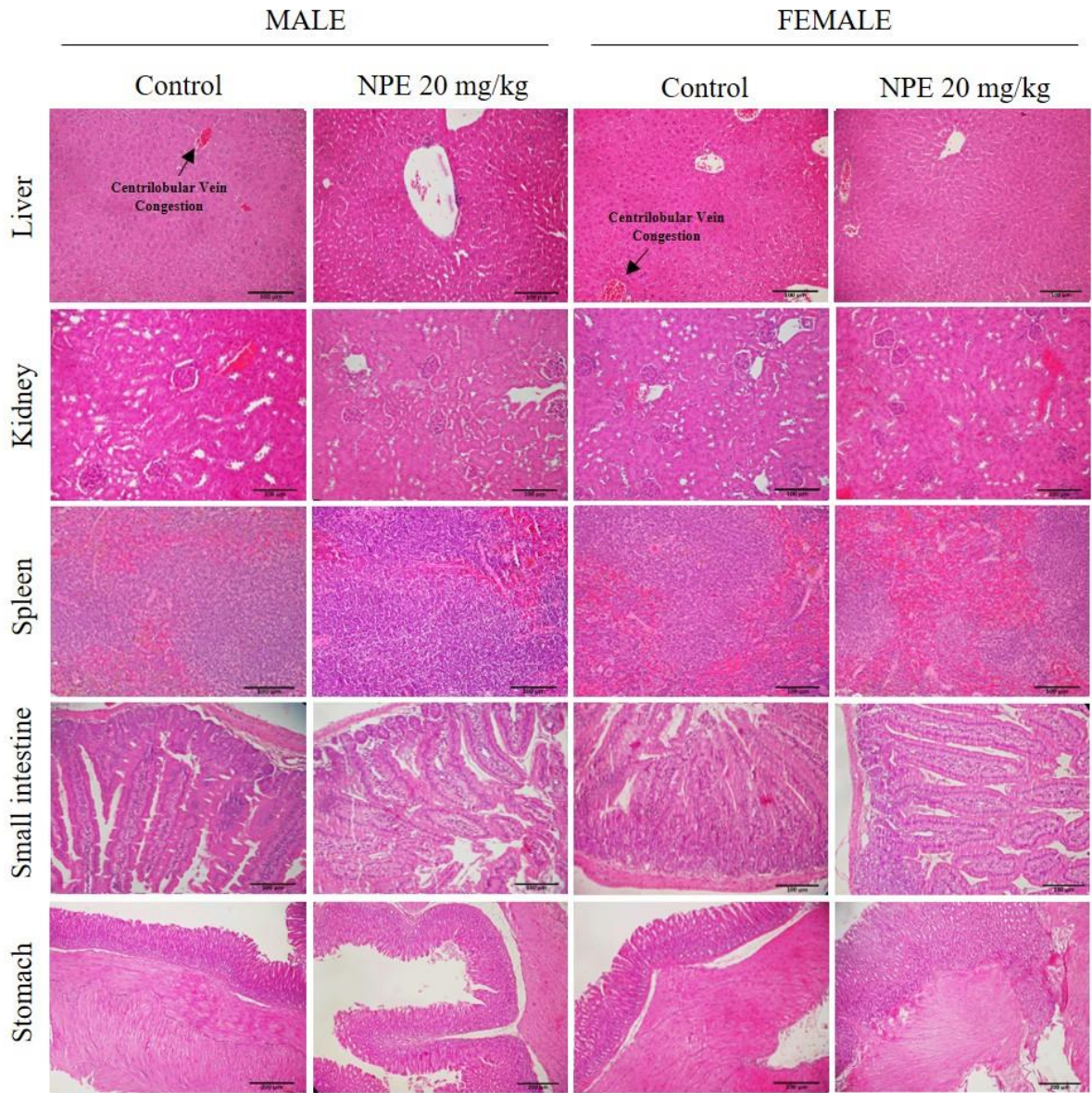


**Fig. 1.** Mean body weight (g) of (A) male and (B) female mice orally treated NPE (5, 10, and 20 mg/kg) for 28 days. Data are expressed as mean  $\pm$  SD. n=6/sex/group.

**Table 1.** Food intake (g/day/animal) of mice orally treated with NPE (5, 10, and 20 mg/kg) for 28 days.

	Control	NPE (mg/kg)		
		5	10	20
<b>Males</b>				
Week 1	3.74	3.02	3.42	3.33
Week 2	3.79	3.28	3.41	3.02
Week 3	3.63	3.64	3.53	2.93
Week 4	3.79	3.26	3.10	3.09
Average	3.74 ± 0.07	3.30 ± 0.26*	3.37 ± 0.18	3.09 ± 0.17*
<b>Females</b>				
Week 1	3.11	2.84	2.41	2.39
Week 2	3.12	3.25	2.62	2.57
Week 3	2.97	3.22	2.95	2.94
Week 4	3.24	3.14	2.52	3.02
Average	3.11 ± 0.11	3.11 ± 0.18	2.62 ± 0.23*	2.73 ± 0.29

Asterisk indicates values that were different ( $p < 0.05$ ) from the respective control (saline 0.9%).



**Fig. 2.** Representative images of histopathological findings in the liver (x200), kidney (x200), spleen (x200), small intestine (x200) and stomach (x100) of male and female mice orally administered 0 (control) or 20 mg NPE/kg for 28 days. Scale bars = 100  $\mu$ m (liver, kidney, spleen, and small intestine) and 200  $\mu$ m (stomach).

## REFERÊNCIAS

- ABOU ASSI, R. *et al.* *Morinda citrifolia* (Noni): A comprehensive review on its industrial uses, pharmacological activities, and clinical trials. **Arabian Journal of Chemistry**, Riyadh, v. 10, n. 5, p. 691–707, 2017.
- AFONSO, D.; JORGE, R.; MOREIRA, A. C. Alimentos com e sem glúten - análise comparativa de preços de mercado. **Acta Portuguesa de Nutrição**, Porto, v. 4, n. 4, p. 10–16, 2016.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Informe Técnico nº. 25, de 29 de maio de 2007, atualizado em 18 de junho de 2008**: Esclarecimentos sobre as avaliações de segurança realizadas de produtos contendo *Morinda citrifolia*. [S. l.]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/25\\_290507.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/25_290507.htm). Acesso em: 03 maio 2021.
- AHMAD, A. N.; DAUD, Z. A. M.; ISMAIL, A. Review on potential therapeutic effect of *Morinda citrifolia* L. **Current Opinion in Food Science**, [s. l.] v. 8, p. 62–67, 2016.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para comprovação da segurança de alimentos e ingredientes, nº 23 jul. 2019**. [S. l.]. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents>. Acesso em: 03 maio 2021.
- ARSLAIN, K. *et al.* Determinants of gluten-free diet adoption among individuals without celiac disease or non-celiac gluten sensitivity. **Appetite**, [s. l.], v. 156, p. 1-8, 2021.
- ASRARKULOVA, A. S.; BULUSHOVA, N. V. Wheat gluten and its hydrolysates. possible fields of practical use. **Applied Biochemistry and Microbiology**, [s. l.], v. 54, n. 9, p. 825–833, 2018.
- BALAMI, J.S. *et al.* Thrombolytic agents for acute ischaemic stroke treatment: the past, present and future. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, [s. l.], v. 12, p. 145-154, 2013.
- BEERS, E. P.; WOFFENDEN, B. J.; ZHAO, C. Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. **Plant Mol Biol**, [s. l.], v. 44, p. 399–415, 2000.
- BHALERAO R. *et al.* Gene expression in autumn leaves. **Plant Physiol**, [s. l.], v. 131, p. 430–442, 2003.
- BLAAUBOER, B. J. *et al.* Considering new methodologies in strategies for safety assessment of foods and food ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 91, p. 19–35, 2016.
- BOUZIAT, R. *et al.* Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease. **Science**, [s. l.], v. 356, p. 44–50, 2017.
- BUDDRICK, O.; CORNELL, H. J.; SMALL, D. M. Reduction of toxic gliadin content of wholegrain bread by the enzyme caricain. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 170, p. 343–347, 2015.
- BYASS, P.; KAHN, K.; IVARSSON, A. The global burden of childhood coeliac disease: A neglected component of diarrhoeal mortality? **Plos One**, [s. l.], v. 6, n. 7, p. 1–8, 2011.



CABANILLAS, B. Gluten-related disorders: celiac disease, wheat allergy, and nonceliac gluten sensitivity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 60, n. 15, p. 2606–2621, 2019.

CAMPOS, D. C. O. *et al.* First isolation and antinociceptive activity of a lipid transfer protein from noni (*Morinda citrifolia*) seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 86, p. 71–79, 2016.

CAMPOS, D. C. O. *et al.* *Morinda citrifolia* lipid transfer protein 1 exhibits anti-inflammatory activity by modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 103, p. 1121–1129, 2017.

CAPUTO, I. *et al.* Enzymatic strategies to detoxify gluten: Implications for celiac disease. **Enzyme Research**, [s. l.], v. 2010, p. 1–9, 2010.

CARROCCIO, A. *et al.* Duodenal and rectal mucosa inflammation in patients with non-celiac wheat sensitivity. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 682–690, 2019.

CHAN-BLANCO, Y. *et al.* The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 19, p. 645–654, 2006.

CODEX ALIMENTARIUS. **Standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten: CXS 118-1979**. [S. l.]: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2015, 3 p. Disponível em: <http://fao.org/fao-who-codexalimentarius>. Acesso em: 19 mar. 2021.

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

CRESPO PÉREZ, L. *et al.* Non-dietary therapeutic clinical trials in coeliac disease. **European Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 9–14, 2012.

DU PRÉ, M. F.; SOLLID, L. M. T-cell and B-cell immunity in celiac disease. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, [s. l.], v. 29, p. 413–423, 2015.

DUBEY, V. K. *et al.* Papain-like peptidases: applications of their inhibitors. **African Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 1077–1086, 2007.

ELMALIMADI, M. B. *et al.* Controlled enzymatic hydrolysis for improved exploitation of the antioxidant potential of wheat gluten. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 109, p. 548–557, 2017.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Parecer nº EFSA-Q-2005-236, de 1 de setembro de 2006**: Opinion on a request from the Commission related to the safety of noni juice (juice of the fruits of *Morinda citrifolia*). [S. l.]. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu>. Acesso em: 19 mar. 2021.

FAO. **Crop Prospects and Food Situation**. Quarterly Global Report N° 4. Rome, 2020. 50 p. Disponível em: [www.fao.org/faostat/](http://www.fao.org/faostat/). Acesso em: 20 abr. 2021.

FARIAS, V. A. *et al.* Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit as a new source of milk-clotting cysteine peptidases. **Food Research International**, [s. l.], v. 127, p. 1-10, 2020.

FASANO, A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: The biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 151–175, 2011.

FEIJOO-SIOTA, L.; VILLA, T. G. Native and biotechnologically engineered plant peptidases with industrial applications. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 4, n. 6, p. 1066–1088, 2011.

FIOR MARKETS. Peptidases market by source (animal, plant, microbial), formulation (lyophilized powder, liquid), application, region, global industry analysis, market size, share, growth, trends, and forecast 2021 to 2028. [S. l.], 2021. Disponível em: [www.fiormarkets.com](http://www.fiormarkets.com). Acesso em: 10 maio 2021.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Food labelling: gluten-free labelling of foods. Final Rule Federal Register**. [S. n.], [S. l.], v. 78, n. 150, p. 47154–47179, 2013.

FOROUGH, F.; KESHAVARZ, T.; EVANS, C. S. Specificities of peptidases for use in leather manufacture. **J Chem Technol Biotechnol**, [s. l.], v. 81, p. 257–261, 2006.

FUCIÑOS, C. *et al.* Effectiveness of proteolytic enzymes to remove gluten residues and feasibility of incorporating them into cleaning products for industrial purposes. **Food Research International**, [s. l.], v. 120, p. 167–177, 2019.

GELLER, M. Anafilaxia induzida por exercício: atualização. **Brazilian Journal of Allergy and Immunology**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 40–46, 2015.

GENELHU, M. S. *et al.* Use of a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* as a protective agent during DNA extraction. **Braz J Med Biol Res**, [s. l.], v. 31, p. 1129–1132, 1998.

GHANEMI, A. How to define a pharmacological or a toxic food? **Alexandria Journal of Medicine**, [s. l.], v. 51, p. 359-360, 2015.

GIESLER, L. *et al.* Hydrolysis of wheat gluten by combining peptidases of *Flammulina velutipes* and electro dialysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 61, n. 36, p. 8641–8649, 2013.

GIL-HUMANES, J. *et al.* Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, [s. l.], v. 107, n. 39, p. 17023–17028, 2010.

GREEN, P. H. R.; LEBWOHL, B.; GREYWOODE, R. Celiac disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, New York, v. 135, n. 5, p. 1099–1106, 2015.

GURUMALLES, P. *et al.* A systematic reconsideration on peptidases. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 128, p. 254–267, 2019.

HAGER, A. S. *et al.* Nutritional properties and ultra-structure of commercial gluten free flours different botanical sources compared to wheat flours. **Journal of Cereal Science**, [s. l.], v. 56, n. 2, p. 239–247, 2012.

HANADA, K. *et al.* Isolation and characterization of e-64, a new thiol peptidase inhibitor. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tóquio, v. 42, n. 3, p. 523–528, 1978.

HEADON, D.; WALSH, G. The industrial production of enzymes. **Biotechnol Adv**, [s. l.], v. 12, p. 635–46, 1994.

IGARASHI, Y. *et al.* PMAP: Databases for analyzing proteolytic events and pathways. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, p. 611–618, 2009.

JAYARAMAN, S. K.; MANOHARAN, M. S.; ILLANCHEZIAN, S. Antibacterial, antifungal and tumor cell supression potential of *Morinda citrifolia* fruit extracts. **Int. J. Integr. Biol**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 44-49, 2008.

JAYAWARDANA, I. A. *et al.* The kiwifruit enzyme actinidin enhances the hydrolysis of gluten proteins during simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 341, p. 1-8, 2021.

JEYAPRAKASH, K.; ALSALHI, M. S.; DEVANESAN, S. Anticancer and antioxidant efficacy of silver nanoparticles synthesized from fruit of *Morinda citrifolia* Linn on Ehrlich ascites carcinoma mice. **Journal of King Saud University - Science**, [s. l.], v. 32, n. 7, p. 3181–3186, 2020.

JIANG, W. B. *et al.* Senescence-related serine peptidase in parsley. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 50, p. 377–382, 1998.

KING, J. A. *et al.* Incidence of celiac disease is increasing over time: a systematic review and meta-analysis. **The American Journal of Gastroenterology**, New York, v. 115, n. 4, p. 507–525, 2020.

KNORR, V. *et al.* Production and application of barley malt extract with high peptidase activity for the degradation of gluten in wort. **European Food Research and Technology**, [s. l.], v. 242, n. 4, p. 585–597, 2016.

KONG, X.; ZHOU, H.; QIAN, H. Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 101, n. 2, p. 615–620, 2007.

LEBWOHL, B.; LUDVIGSSON, J. F.; GREEN, P. H. R. The unfolding story of celiac disease risk factors. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 632–635, 2014.

LEE, A. R. *et al.* Persistent economic burden of the gluten free diet. **Nutrients**, [s. l.], v. 11, n. 399, p. 1–8, 2019.

- LIN, Y. L. *et al.* Beneficial effects of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice on livers of high-fat dietary hamsters. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 140, p. 31–38, 2013.
- LIU, H. *et al.* Role of papain-like cysteine peptidases in plant development. **Front. Plant Sci**, [s. l.], v. 9, p. 1-10, 2018.
- LOHANI, M. *et al.* Immunomodulatory actions of a polynesian herb noni (*Morinda citrifolia*) and its clinical applications. **Complementary Therapies in Medicine**, Londres, v. 47, p. 1-10, 2019.
- LÓPEZ-OTÍN, C.; OVERALL, C. M. Peptidase degradomics: A new challenge for proteomics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 3, p. 509–519, 2002.
- LUDVIGSSON, J. F. *et al.* The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. **Gut**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 43–52, 2012.
- LY, H. T. *et al.* Phytochemical analysis and wound-healing activity of noni (*Morinda citrifolia*) leaf extract. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 1–15, 2020.
- MAHATTANADUL, S. *et al.* Effects of *Morinda citrifolia* aqueous fruit extract and its biomarker scopoletin on reflux esophagitis and gastric ulcer in rats. **J. Ethnopharmacol**, [s. l.], v. 134, n. 2, p. 243–250, 2011.
- MANDUKHAIL, S. U.; AZIZ, N.; GILANI, A.H. Studies on antidyslipidemic effects of *Morinda citrifolia* (noni) fruit, leaves and root extracts. **Lipid. Health Dis**, Londres, v. 9, n. 88, p. 1–6, 2010.
- MARTINEZ, M. *et al.* Plant peptidases: from key enzymes in germination to allies for fighting human gluten-related disorders. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 10, p. 1-8, 2019.
- McGRATH, M. E. The lysosomal cysteine peptidases. **Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure**, [s. l.], v. 28, p. 181-204, 1999.
- MELLO, V. J. *et al.* The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 15, p. 237–244, 2008.
- MILLONIG, G.; STADLMANN, S.; VOGEL, W. Herbal hepatotoxicity: acute hepatitis caused by a noni preparation (*Morinda citrifolia*). **European Journal Gastroenterology Hepatology**, Londres, v. 17, n. 4, p. 445–447, 2005.
- MOHAMAD SHALAN, N. A. A.; MUSTAPHA, N. M.; MOHAMED, S. Chronic toxicity evaluation of *Morinda citrifolia* fruit and leaf in mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 83, p. 46–53, 2017.
- MORTON, J. F. The ocean-going (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae) and some of its "colorful " relatives. **Economic Botany**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 241–256, 1992.

MOTSHAKERI, M.; GHAZALI, H. M. Nutritional, phytochemical and commercial quality of noni fruit: A multi-beneficial gift from nature. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 118–129, 2015.

NELSON, S.C. *Morinda citrifolia* L.: Rubiaceae coffee family. **Permanent Agriculture Resources (PAR)**, 2006. Disponível em: [http://www.ctahr.hawaii.edu/noni/downloads/morinda\\_species\\_profile.pdf](http://www.ctahr.hawaii.edu/noni/downloads/morinda_species_profile.pdf). Acesso em: 27 abr. 2021.

NIWINSKI, M. M. Advances in celiac disease and gluten-free diet. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 108, n. 4, p. 661–672, 2008.

OLIVARES, M. *et al.* Double-blind, randomised, placebo-controlled intervention trial to evaluate the effects of *Bifidobacterium longum* CECT 7347 in children with newly diagnosed celiac disease. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 112, n. 1, p. 30–40, 2014.

OTSUKI, N. *et al.* Aqueous extract of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects. **J. Ethnopharmacol**, [s. l.], v. 127, p. 760–767, 2010.

OTTO, H. H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine peptidases and their inhibitors. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 133–171, 1997.

PARDO, M. F. *et al.* Purification of balansain I, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 48, p. 3795–3800, 2000.

PÉREZ-SILVA, J. G. *et al.* The Degradome database: expanding roles of mammalian peptidases in life and disease. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 44, p. 351–355, 2016.

POLGAR, L.; HALASZ, P. Current problems in mechanistic studies of serine and cysteine proteinases. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 207, p. 1-10, 1982.

POURMOHAMMADI, K.; ABEDI, E. Enzymatic modifications of gluten protein: oxidative enzymes. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 356, p. 1-15, 2021.

PURANIK, D. S. *et al.* Preclinical evaluation of antidiabetic activity of noni fruit juice. **International Journal of Bioassays**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 475–482, 2013.

QUIRCE, S.; DIAZ-PERALES, A. Diagnosis and management of grain-induced asthma. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 348–356, 2013.

RADCHUK, V. *et al.* Vacuolar processing enzyme 4 controls grain size in barley by executing programmed cell death in pericarp. **New Phytologist**, Londres, v. 218, p. 1127–1142, 2018.

RAO, M. B. *et al.* Molecular and biotechnological aspects of microbial peptidases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAVIKUMARA, M.; NOOTIGATTU, V. K. T.; SANDHU, B. K. Ninety percent of celiac disease is being missed. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, New York,

v. 45, p. 497–499, 2007.

RAWLINGS, N. D. *et al.* The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 46, p. 624–632, 2018.

RAWLINGS, N. D.; BARRET, A. J. The peptidase database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 323–325, 2000.

RIBEIRO, M. *et al.* Next-generation therapies for celiac disease: The gluten-targeted approaches. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 75, p. 56–71, 2018.

ROSELL, C. M. *et al.* Cereals for developing gluten-free products and analytical tools for gluten detection. **Journal of Cereal Science**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 354–364, 2014.

ROSLY, S. M. *et al.* Subchronic oral toxicity study of *Morinda citrifolia* (Mengkudu) in sprague dawley rats. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, Serdang, v. 34, n. 2, p. 341–349, 2011.

SÁNCHEZ-LEÓN, S. *et al.* Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. **Plant Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 902–910, 2018.

SAPONE, A. *et al.* Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. **BMC medicine**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2012.

SARASWATHI, C.D. *et al.* Antiarthritic activity of *Morinda citrifolia* L. fruit juice in complete Freund's adjuvant induced arthritic rats. **Journal Pharmacy Research.**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 1236–1239, 2012.

SAVICKAS, S.; KASTL, P.; AUF DEM KELLER, U. Combinatorial degradomics: precision tools to unveil proteolytic processes in biological systems. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, Amsterdã, v. 1868, p. 1–8, 2020.

SCHALLER, A. A cut above the rest: the regulatory function of plant peptidases. **Planta**, [s. l.], v. 220, n. 2, p. 183–197, 2004.

SCHERF, K. A. Immunoreactive cereal proteins in wheat allergy, non-celiac gluten/wheat sensitivity (NCGS) and celiac disease. **Current Opinion in Food Science**, [s. l.], v. 25, p. 35–41, 2019.

SCHERF, K. A.; WIESER, H.; KOEHLER, P. Novel approaches for enzymatic gluten degradation to create high-quality gluten-free products. **Food Research International**, [s. l.], v. 110, p. 62–72, 2018.

SCHUMANN, M. *et al.* Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue. **Gut**, [s. l.], v. 57, n. 6, p. 747–754, 2008.

SCHUPPAN, D.; JUNKER, Y.; BARISANI, D. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 137, n. 6, p. 1912–1933, 2009.

- SHANNAHAN, S.; LEFFLER, D. A. Diagnosis and updates in celiac disease. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, Filadélfia, v. 27, n. 1, p. 79–92, 2017.
- SINGH, D. R. *Morinda citrifolia* L. (Noni): A review of the scientific validation for its nutritional and therapeutic properties. **Journal of Diabetes and Endocrinology**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 77-91, 2012.
- SOUZA, A. A. *et al.* Biochimie Lipid transfer protein isolated from noni seeds displays antibacterial activity in vitro and improves survival in lethal sepsis induced by CLP in mice. **Biochimie**, [s. l.], v. 149, p. 9–17, 2018.
- STADLBAUER, V. *et al.* Hepatotoxicity of noni juice: report of two cases. **World Journal Gastroenterology**, Pequim, v. 11, n. 30, p. 4758-4760, 2005.
- STADLBAUER, V. *et al.* Herbal does not at all mean innocuous: the sixth case of hepatotoxicity associated with *Morinda citrifolia* (noni). **American Journal Gastroenterology**, New York, v. 103, n. 9, p. 2406–2407, 2008.
- STAMNAES, J.; SOLLID, L. M. Celiac disease: Autoimmunity in response to food antigen. **Seminars in Immunology**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 343–352, 2015.
- SU, G. *et al.* Insight into the advantages of premixing yeast-wheat gluten and combining ultrasound and transglutaminase pretreatments in producing umami enzymatic protein hydrolysates. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 342, p. 1-8, 2021.
- SUN, Q. *et al.* Comparative analysis on the distribution of peptidase activities among fruits and vegetable resources. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 213, p. 708–713, 2016.
- SZEWINSKA, J.; SIMINSKA, J.; BIELAWSKI, W. The roles of cysteine peptidases and phytocystatins in development and germination of cereal seeds. **J. Plant Physiol**, Alemanha, v. 207, p. 10–21, 2016.
- TAGA, Y. *et al.* Production of a novel wheat gluten hydrolysate containing dipeptidyl peptidase-IV inhibitory tripeptides using ginger peptidase. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tóquio, v. 81, n. 9, p. 1823–1828, 2017.
- TARGONI O, TARY L, LEHMANN P. Prevention of murine EAE by oral hydrolytic enzyme treatment. **Journal of Autoimmunity**, [s. l.], v. 12, p. 191–198, 1999.
- TAVANO, O. L. *et al.* Biotechnological applications of peptidases in food technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Hoboken, v. 17, n. 2, p. 412–436, 2018.
- TORNKVIST, A.; LIU, C.; MOSCHOU, P. N. Proteolysis and nitrogen: emerging insights. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 70, p. 2009–2019, 2019.
- VAN DER HOORN, R. A. L.; JONES, J. D. G. The plant proteolytic machinery and its role in defense. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 7, p. 400–407, 2004.

VAN DER HOORN, R. A. Plant peptidases: from phenotypes to molecular mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, [s. l.], v. 59, p. 191–223, 2008.

VERMELHO, A. B. Enzimas proteolíticas: aplicações biotecnológicas. *In: Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. 1. ed. Rio de Janeiro: **Interciências Ltda**, 2008. p. 273-287.

VIZOVIŠEK, M. *et al.* Current trends and challenges in proteomic identification of peptidase substrates. **Biochimie**, [s. l.], v. 122, p. 77–87, 2016.

WANG, M. Y. *et al.* *Morinda citrifolia* (noni): A literature review and recent advances in noni research. Review. **Acta Pharmacologica Sinica**, Pequim, v. 23, p. 1127–1141, 2002.

WATSON, H. G. *et al.* Peptidomics of an industrial gluten-free barley malt beer and its non-gluten-free counterpart: characterisation and immunogenicity. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 355, n. 1, p. 1-9, 2021.

WEST, B. J.; JENSEN, C. J.; WESTENDORF, J. Noni juice is not hepatotoxic. **World Journal of Gastroenterology**, Pequim, v. 12, n. 22, p. 3616-3619, 2006.

WEST, B. J.; SU, C. X.; JENSEN, C. J. Hepatotoxicity and subchronic toxicity tests of *Morinda citrifolia* (noni) fruit. **The Journal of toxicological sciences**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 581–585, 2009.

WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 115–119, 2007.

YADAV, R. P.; PATEL, A. K.; JAGANNADHAM, M. V. Purification and biochemical characterization of a chymotrypsin-like serine peptidase from *Euphorbia nerifolia* Linn. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 46, p. 1654–1662, 2011.

YU, E. L. *et al.* Acute hepatotoxicity after ingestion of *Morinda citrifolia* (noni berry) juice in a 14-year-old boy. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, New York, v. 52, n. 2, p. 222–224, 2011.

YÜCE, B. *et al.* Hepatitis induced by noni juice from *Morinda citrifolia*: a rare cause of hepatotoxicity or the tip of the iceberg? **Digestion**, [s. l.], v. 73, n. 2-3, p. 167-170, 2006.

ZHANG, B. *et al.* Characterization of actinidin from chinese kiwifruit cultivars and its applications in meat tenderization and production of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. **LWT Food Sci Technol**, [s. l.], v. 78, p. 1–7, 2017.