



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

AMANDA DIAS DA ROCHA LIMA

APLICAÇÃO DE PROTEASES DO PERICARPO DOS FRUTOS DE *Morinda citrifolia*
L. NA PRODUÇÃO DE QUEIJOS

FORTALEZA

2017

AMANDA DIAS DA ROCHA LIMA

**APLICAÇÃO DE PROTEASES DO PERICARPO DOS FRUTOS DE *Morinda citrifolia*
L. NA PRODUÇÃO DE QUEIJOS**

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira

Coorientadora: Mestre Vilmará Albuquerque de Farias

FORTALEZA

2017

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)

L696a Lima, Amanda Dias da Rocha.
Aplicação de proteases do pericarpo dos frutos de *Morinda citrifolia* L. na produção de queijos / Amanda Dias da Rocha Lima. – 2017.
57 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira.

Coorientação: Profa. Ma. Vilmara Albuquerque de Farias.

1. Protease vegetal. 2. Coagulação de leite. 3. Segurança alimentar. 4. Prospecção tecnológica. 5. Patente. I. Título.

CDD 661

AMANDA DIAS DA ROCHA LIMA

**APLICAÇÃO DE PROTEASES DO PERICARPO DOS FRUTOS DE *Morinda citrifolia*
L. NA PRODUÇÃO DE QUEIJOS**

Monografia apresentada ao curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: 01/12/2017.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Mirella Leite Pereira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico esse trabalho à minha família, em especial meus avós e meus pais, que tanto contribuem na minha formação como pessoa.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** que me abençoa com vida e saúde. Pela Sua providência em colocar no meu caminho pessoas maravilhosas que me ajudam a prosseguir a cada dia.

A toda minha família, que eu tanto amo e é a melhor base que eu poderia ter. Principalmente meus pais, **Ozana** e **Telvanio**, por apoiarem minhas decisões, pelas conversas e pelo incentivo, pelo constante cuidado com minha educação. Vocês contribuíram enormemente para minha chegada até aqui.

Ao meu orientador, professor **Hermógenes David de Oliveira**, que me acolheu tão bem como parte de sua família científica, desde o meu primeiro dia no laboratório, há mais de cinco anos. Agradeço a Deus por ter me guiado até esse exemplo de professor, pesquisador e pessoa. Obrigada pela paciência e confiança, por acreditar tanto em mim, por trazer luz e novo ânimo nos momentos mais precisos. Aprendi muito em todos esses anos com o senhor e nada desse trabalho seria possível sem o seu suporte.

Ao meu melhor amigo **Rômulo Marques**, com quem tive o prazer de compartilhar inúmeros momentos marcantes, fossem esses meus, dele ou nossos, desde a escola até hoje. Obrigada pela companhia e ajuda constante, por se fazer disponível para ouvir meus desabafos, por me acalmar e animar, e por ter mais fé em mim do que eu mesma. Palavras não são suficientes para expressar o quão importante você é na minha vida.

Aos meus mais que queridos **Reveladores**, pelas palavras de suporte e conforto, mesmo quando os momentos eram os mais difíceis para todos nós. Pela companhia, pelas risadas e por viverem junto comigo tantos momentos dessa graduação. Vocês são meus presentes da Biotecnologia.

À minha amiga **Ju**, com quem tive a felicidade de conviver do dia da matrícula, passando por madrugadas de estudo, até a finalização desse trabalho. À minha querida **Lud**, com quem partilho aflições, desabafos e alegrias. Obrigada pela parceria, que caminemos sempre empurrando uma a outra para cima. Às minhas amigas **Trícia** e **Kat**, pela força. Quero levar a amizade de todas vocês para a vida.

Aos meus colegas de bancada no Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas (BioAP), **Adson**, **Adrienne**, **Sheila**, **Cristiane**, **Acrísio**, **Éwerton**, **Ingrid**, **Carol Dantas**, **Chris Veríssimo** e **Lucas** pela ajuda no trabalho e pelos bons momentos de descontração. Em especial à **Vilmara**, minha coorientadora, pelo grande auxílio na condução desse trabalho e pela amizade.

Às amigas **Andréa** e **Dyély**, que estão comigo desde o meu primeiro dia de laboratório. Pelo carinho, atenção e companheirismo de sempre. Por me ensinarem muito do que aprendi em pesquisa, seja pipetar, conduzir um experimento organizadamente ou cuidar dos animais. Principalmente à Andréa, pela disponibilidade em ajudar nos experimentos, por esclarecer as mais variadas dúvidas, pelas dicas em seminários, resumos e até nas disciplinas.

À professora **Márjory**, que eu muito admiro, pela contribuição como uma das administradoras do BioAP, pela excelência ao lecionar, pela paciência e compreensão em sua atuação como vice-coordenadora do curso de Biotecnologia.

Ao corpo docente da graduação em Biotecnologia e aos outros professores da Universidade Federal do Ceará envolvidos na minha formação, que, com sua dedicação, possibilitaram o meu acesso a uma educação de excelência.

Ao querido **Gilmar**, secretário do curso de Biotecnologia, pela sua constante disponibilidade para esclarecer infinitas dúvidas, por ajudar nos processos burocráticos e pela torcida.

À **Teca**, por cuidar tão bem do nosso ambiente no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) e pela simpatia.

Aos integrantes dos laboratórios de pesquisa do DBBM, pela cooperação nos mais variados aspectos de minha pesquisa.

Aos coordenadores do Laboratório de Informática do Centro de Ciências Agrárias, **Natan** e **Carlos**, por serem compreensíveis e flexíveis nos meus horários como bolsista nesse último ano de curso.

A Universidade Federal do Ceará, por proporcionar um ambiente agradável, pelos constantes eventos científicos e culturais promovidos e, sobretudo, pelo ensino de qualidade.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPQ e FUNCAP, pelos investimentos realizados em ensino e pesquisa, os quais possibilitaram a elevação do meu nível de qualificação profissional.

RESUMO

Uma importante aplicação de proteases é na coagulação do leite, etapa fundamental da produção de queijos. Neste âmbito, a quimosina oriunda do abomaso de bezerros é um tradicional coagulante. Entretanto, o seu uso tem sido desestimulado por fatores como disponibilidade de animais, crescimento do número de adeptos de dietas vegetarianas e razões culturais e religiosas. Nesse contexto, proteases de origem vegetal são alternativas interessantes a quimosina animal. Recentemente, mostrou-se que proteases cisteínicas presentes nos frutos de *Morinda citrifolia* L. (noni) são capazes de hidrolisar proteínas do leite de modo competitivo com o coalho animal comercial. Diante disso, o presente trabalho buscou analisar a viabilidade de uso das proteases de noni como novo produto para fabricação de queijos. Para este fim, observaram-se os seguintes aspectos: os pré-requisitos da legislação brasileira para a regulamentação de produtos alimentares; e as tendências dos mercados de proteases em geral e vegetal na produção de queijos por meio de prospecção tecnológica de patentes. Primeiramente, definiu-se o novo produto como extrato do purê de noni (EPN) na sua forma em pó. O mesmo é formulado com os coadjuvantes de tecnologia L-cisteína e cloreto de cálcio. Algumas características relevantes de EPN são a grande porção de carboidratos (57,79%) e a digestão de suas proteínas em simulação gástrica *in vitro*. A digestibilidade por pepsina sugere a ausência de indícios de proteínas alergênicas. Realizou-se ainda teste de toxicidade subcrônica em roedores tratando-os com dose de 5 mg/kg das proteínas de EPN. Os animais apresentaram sinais clínicos e necropsia normais. O peso fresco relativo dos órgãos e as análises hematológicas também foram normais, com algumas alterações pontuais. Contudo, a correta interpretação desses dados exige a correlação com resultados de análises bioquímicas e histopatológicas. Com relação a prospecção tecnológica, encontraram-se muitas patentes acerca de proteases e pouquíssimas acerca de proteases vegetais. Os principais investidores no ramo pesquisado são empresas e as principais jurisdições de proteção são China e Estados Unidos. O Brasil é praticamente ausente nesse setor de inovação, uma vez que a maior parte das patentes protegidas no território nacional é de origem estrangeira. Finalmente, verificou-se que são poucas as inovações com coagulantes para produção de queijo, tanto no Brasil quanto no exterior. Portanto, esse ramo se mostra um ponto de futuro desenvolvimento tecnológico, sendo o extrato do purê de noni um forte candidato para atuação no setor.

Palavras-chave: Protease vegetal. Coagulação de Leite. Segurança alimentar. Prospecção Tecnológica. Patente.

ABSTRACT

Proteases can be utilised for milk clotting, a fundamental step in cheese manufacturing. Chymosin from the calf abomasum is a traditional coagulant. However, its use has been discouraged due to decreased animal supply, growing numbers of vegetarian diets, and cultural and religious reasons. In this context, plant proteases are an interesting alternative to animal chymosin. It has recently been shown that cysteine proteases from *Morinda citrifolia* L. (noni) fruits are capable of hydrolysing milk proteins competitively with commercial animal rennet. Therefore, the present work aimed to analyse the feasibility of utilising noni proteases as a new product for cheese making. Thus, the following aspects were considered: the Brazilian law requirements for food products regulation; and trends in the general protease and vegetable markets in the production of cheeses through technological patent prospecting. First, the new product was defined as noni puree extract (EPN) in its powder form. It is formulated with L-cysteine and calcium chloride. Some relevant characteristics of EPN are the major composition of carbohydrates (57.79%) and its proteins hydrolyses in gastric simulation *in vitro*. Pepsin digestibility gives no evidence of allergenic proteins. Subchronic toxicity testing on rodents was also performed by treating them with a dose of 5 mg/kg of EPN proteins. All animals survived and showed normal clinical signs and necropsy. Relative fresh body weight and haematological analyses were also normal, with some specific changes. However, for an accurate interpretation of these data, a correlation with results of biochemical and histopathological analyses is required. Regarding the technological prospecting, there were many patents on proteases and very few on plant proteases, both in the worldwide collection of the European platform Espacenet and in the Brazilian repository of the National Institute of Industrial Property. The main investors are companies and the main protection markets are China and the United States. Brazil is practically absent in this segment of innovation, since most patents protected nationally are from foreign origin. Therefore, milk-clotting enzymes are an area with plenty opportunities for technological development, being the noni puree extract a meaningful candidate to be exploited.

Keywords: Plant protease. Milk-clotting. Food safety. Technological forecasting. Patent.

SUMÁRIO

| | | |
|----------------|--|-----------|
| 1 | PRIMEIRO CAPÍTULO – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 11 |
| 1.1 | Enzimas industriais..... | 11 |
| 1.2 | Proteases..... | 13 |
| 1.2.1 | <i>Proteases e a produção de queijos.....</i> | 15 |
| 1.3 | <i>Morinda citrifolia L. (noni) e seus usos industriais.....</i> | 16 |
| 1.3.1 | <i>Proteases de noni.....</i> | 18 |
| 1.4 | Objetivos gerais..... | 21 |
| 2 | SEGUNDO CAPÍTULO – COMPROVAÇÃO DA SEGURANÇA ALIMENTAR DAS PROTEASES DO PERICARPO DOS FRUTOS DE NONI..... | 22 |
| 2.1 | Caracterização do problema e justificativa..... | 22 |
| 2.2 | Metodologia..... | 23 |
| 2.2.1 | <i>Identificação do perigo.....</i> | 23 |
| 2.2.2 | <i>Caracterização do perigo.....</i> | 24 |
| 2.2.2.1 | <i>Estudos toxicológicos: toxicidade subcrônica em roedores.....</i> | 24 |
| 2.3 | Resultados e discussão..... | 25 |
| 2.3.1 | <i>Identificação do perigo.....</i> | 25 |
| 2.3.1.1 | <i>Denominação do produto e formulação.....</i> | 25 |
| 2.3.1.2 | <i>Composição química e digestibilidade com pepsina.....</i> | 27 |
| 2.3.2 | <i>Caracterização do perigo.....</i> | 29 |
| 2.3.2.1 | <i>Estudos toxicológicos: toxicidade subcrônica em roedores.....</i> | 29 |
| 2.4 | Conclusões..... | 34 |
| 3 | TERCEIRO CAPÍTULO – PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE PATENTES RELATIVAS A PROTEASES NA PRODUÇÃO DE QUEIJOS..... | 35 |
| 3.1 | Caracterização do problema e justificativa..... | 35 |
| 3.2 | Metodologia..... | 36 |
| 3.2.1 | <i>Buscas gerais: proteases e proteases vegetais.....</i> | 36 |
| 3.2.2 | <i>Buscas específicas: proteases e proteases vegetais aplicadas na tecnologia de fabricação de queijos.....</i> | 37 |
| 3.3 | Resultados e Discussão..... | 37 |

| | | |
|--------------|---|----|
| 3.3.1 | <i>Buscas gerais</i> | 39 |
| 3.3.1.1 | <i>Buscas gerais no Espacenet</i> | 40 |
| 3.3.1.2 | <i>Buscas gerais no INPI</i> | 44 |
| 3.3.2 | <i>Buscas específicas</i> | 46 |
| 3.4 | Conclusões | 50 |
| | REFERÊNCIAS | 51 |

1 PRIMEIRO CAPÍTULO – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Enzimas industriais

Enzimas são majoritariamente proteínas naturais aos organismos vivos com função de catalisar as reações biológicas. Segundo o sistema de classificação da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), essas moléculas são divididas em seis grandes classes de acordo com o tipo de reação catalisada. A saber, oxirredutases (EC 1), transferases (EC 2), hidrolases (EC 3), liases (EC 4), isomerases (EC 5) e ligases (EC 6). Cada classe é composta por diversas subclasses e a cada molécula é atribuída uma numeração única. Por exemplo, o código EC 3.4.22.2 refere-se à papaína isolada do látex dos frutos de *Carica papaya*, uma hidrolase (dígito 3), pertencente à subclasse das peptidases (dígito 4), a qual promove clivagem dependente de cisteína no interior de cadeias peptídicas (dígito 22) (ENZYME..., 2017).

Diante de sua versatilidade, especificidade e eficiência nos processos naturais dos organismos vivos, observou-se a possibilidade de aplicar as suas propriedades catalíticas em processos de produção industrial como alternativa à catálise química (CHOI; HAM; KIM, 2015). Somente em 2016, o mercado global de enzimas atingiu mais de USD 5 bilhões de dólares e analistas preveem que este setor continue em crescimento nos próximos anos, chegando a valer USD 6,3 bilhões de dólares até 2021 (BBC RESEARCH, 2017; GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2017).

Dentre os grupos de enzimas com maior valor industrial, têm-se as carboidrases (diferentes EC) e as proteases (EC 3.4), ocupando juntas cerca de 70% do mercado mundial. Somente carboidrases somaram mais de USD 2,5 bilhões de dólares em 2016. Predições para 2024 apontam que o valor de mercado de carboidrases e proteases dobrará, com proteases atingindo mais de USD 2 bilhões de dólares (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2017).

Os mais variados tipos de indústria contribuem com o comércio de enzimas aplicando-as em produções químicas, farmacêuticas, cosméticos, têxtil, papel, couro, alimentos e bebidas (CHOI; HAM; KIM, 2015). Nesse contexto, o setor alimentício é o que mais absorve essas moléculas, movimentando cerca de USD 1,5 bilhões de dólares em 2016, com expectativas de crescimento para USD 1,9 bilhões de dólares em 2021 (BBC RESEARCH, 2017). No Brasil, a maior demanda de enzimas, cerca de 30%, parte dos ramos industriais de alimentos e ração (FREDONIA GROUP, 2014).

O quadro 1 traz exemplos de enzimas utilizadas na indústria de alimentos e suas funções. Embora todas as classes dessas moléculas possam ser aplicadas, a importância das hidrolases nesse setor merece destaque (PATEL; SINGHANIA; PANDEY, 2016; SHEORAN; DHANKHAR, 2016). Dentre essas, as proteases são amplamente utilizadas devido a capacidade de alterar propriedades nos alimentos como solubilidade, emulsificação, formação de espuma, redução de alergenicidade, conteúdo de peptídeos bioativos (POKORA *et al.*, 2012).

Quadro 1 - Aplicações gerais das diferentes classes de enzimas na indústria de alimentos.

| Classe | Setor de alimentos | Enzimas | Objetivo |
|----------------|---------------------------|---|--|
| Oxidoreductase | Amido | Glicose oxidase | Aprimorar o armazenamento do alimento por meio da remoção de oxigênio e glicose |
| | Panificação e confeitaria | | Melhorar a qualidade da massa e o condicionamento |
| | | Lipoxigenase | Crescimento da massa, vida de prateleira |
| | | | Fortalecimento da massa e branqueamento de pão |
| | | Lacase | Clarificador de suco e potenciador de sabor (cerveja) |
| Transferase | | Transglutaminase | Agente texturante no processamento de iogurte, salsichas e macarrão onde a reticulação das proteínas proporciona propriedades viscoelásticas melhoradas dos produtos |
| | | Ciclodextrina | Produção de ciclodextrina |
| | | Glucosiltransferase | Síntese de oligômeros de frutose |
| | | Frutosiltransferase | |
| Hidrolase | Panificação e confeitaria | Alfa amilase | Crescimento da massa, vida de prateleira |
| | | Alfa e β -amilase, pululanase e invertase | Produção de vários tipos de xaropes de amido e sacarose |
| | | Fosfolipase | Emulsificação <i>in situ</i> para condicionamento da massa |
| | Bebidas | Celulase, xilanase e pectinase | Clarificação de suco |
| | | Glucanase | Auxílio de filtro |
| | Papaína | Controle de espuma | |

| | | | |
|------------------|--------------|-----------------------------|--|
| | | Renina | Coagulação de proteína |
| | | Lactase | Hidrólise de lactose |
| | Laticínios | Lipase e protease | Maturação do queijo |
| | | Peptidase | Hidrólise de proteínas (soja, glúten) para sabores salgados, maturação de queijo |
| | Ração animal | Fitase | Liberção de fosfato a partir de fitato, digestibilidade aumentada |
| Liase | Bebidas | Acetolactato descarboxilase | Maturação da cerveja |
| | Amido | Glicose isomerase | Produção de vários tipos de xaropes de amido e sacarose |
| Isomerase | | | Isomerização de glicose para frutose |

Fonte: Adaptado de PATEL; SINGHANIA; PANDEY (2016).

1.2 Proteases

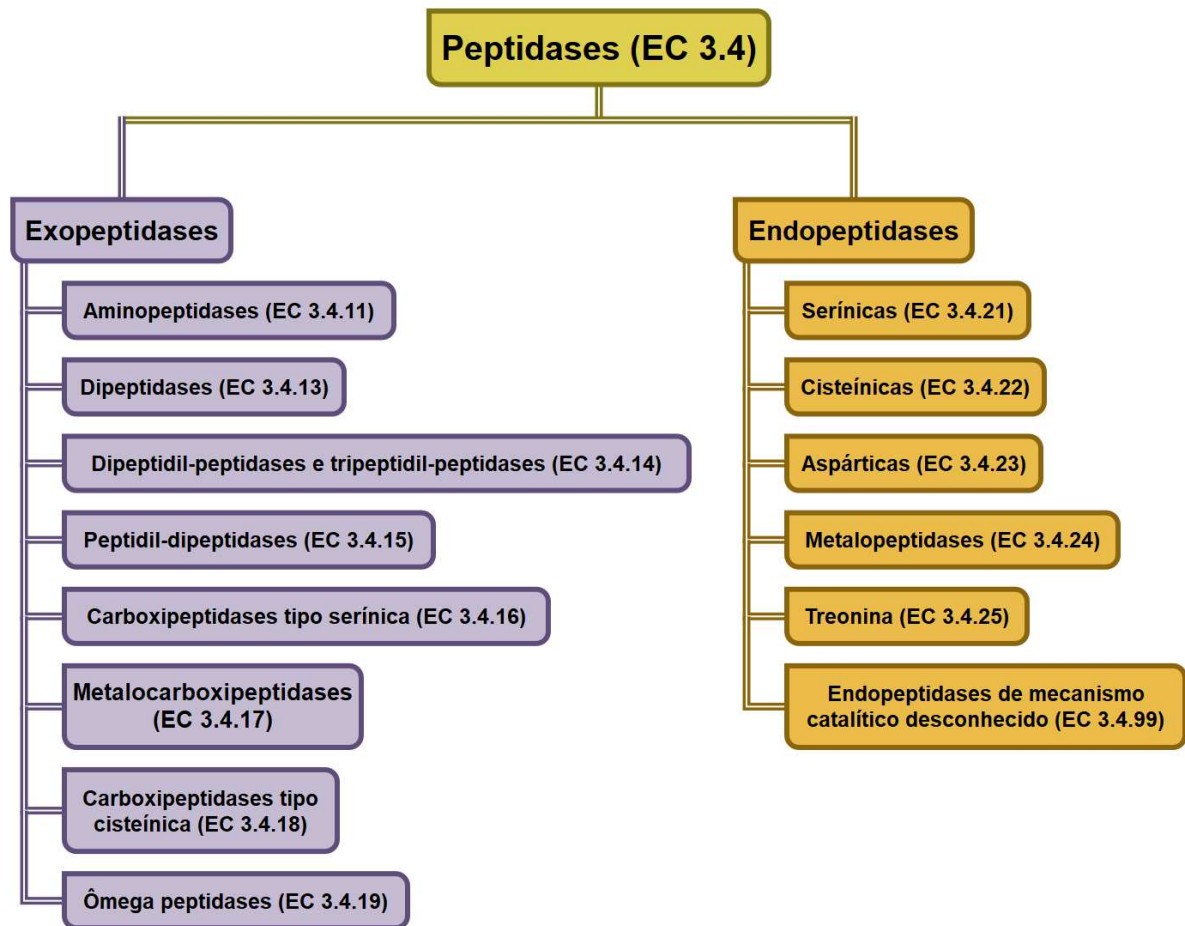
Proteases, peptidases, proteinases ou enzimas proteolíticas são moléculas pertencentes ao grupo das hidrolases, tendo como função a clivagem de ligações peptídicas (EC 3.4). Como já mencionado, a importância dessas moléculas é comprovada pelo fato de constituírem o segundo grupo de enzimas industriais de maior valor de mercado.

Com o objetivo de atender ao crescente interesse comercial e científico, foi criado o banco de dados MEROPS para reunir informações sobre essas moléculas e seus inibidores. Em sua versão 9.13, de julho de 2015, o repositório contava com 523.871 sequências de proteases, divididas em 253 famílias e 61 clãs. Destas, mais de 2.500 possuem informações de caracterização experimental e sequenciamento, enquanto cerca de 200 possuem caracterização experimental, mas apresentam sequência desconhecida ou insuficiente para alocação nas famílias disponíveis (RAWLINGS; BARRETT; FINN, 2015).

Uma divisão simples dessas enzimas é feita de acordo com sua região de clivagem. Proteases que clivam ligações próximas de regiões carboxi ou aminoterminal são ditas exopeptidases, enquanto clivagens no interior da cadeia polipeptídica são promovidas por endopeptidases (MOTYAN; TOTH; TOZSER, 2013). Subdivisões ainda mais específicas podem ser feitas (FIGURA 1), por exemplo, as aminopeptidases são exopeptidases que clivam ligações da região N-terminal, como a enzima aminopeptidase A (EC 3.4.11.7), a qual cliva especificamente um glutamato ou aspartato (ENZYME..., 2017). Outro subgrupo é composto por endopeptidases do tipo cisteínicas, as quais se caracterizam pela presença de

cisteína em seu sítio ativo, sendo a bromelina (EC 3.4.22.32) uma das enzimas mais conhecidas (ENZYME..., 2017).

Figura 1 - Classificação geral das peptidases de acordo com critérios da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.



Fonte: Adaptada (ENZYME..., 2017).

Quando inseridas na indústria de alimentos, alguns dos subsetores de atuação das peptidases são carnes, panificação e confeitaria e laticínios. No tratamento de carnes, as proteases atuam promovendo o amaciamento. Enquanto na panificação e confeitaria, essas são utilizadas em hidrólise gerais de proteínas. Nos laticínios, as peptidases desempenham papel fundamental na produção de queijos, pois são chave nas etapas de coagulação do leite e maturação do queijo (FERNÁNDEZ LUCAS; CASTAÑEDA; HORMIGO, 2017; PATEL; SINGHANIA; PANDEY, 2016).

1.2.1 Proteases e a produção de queijos

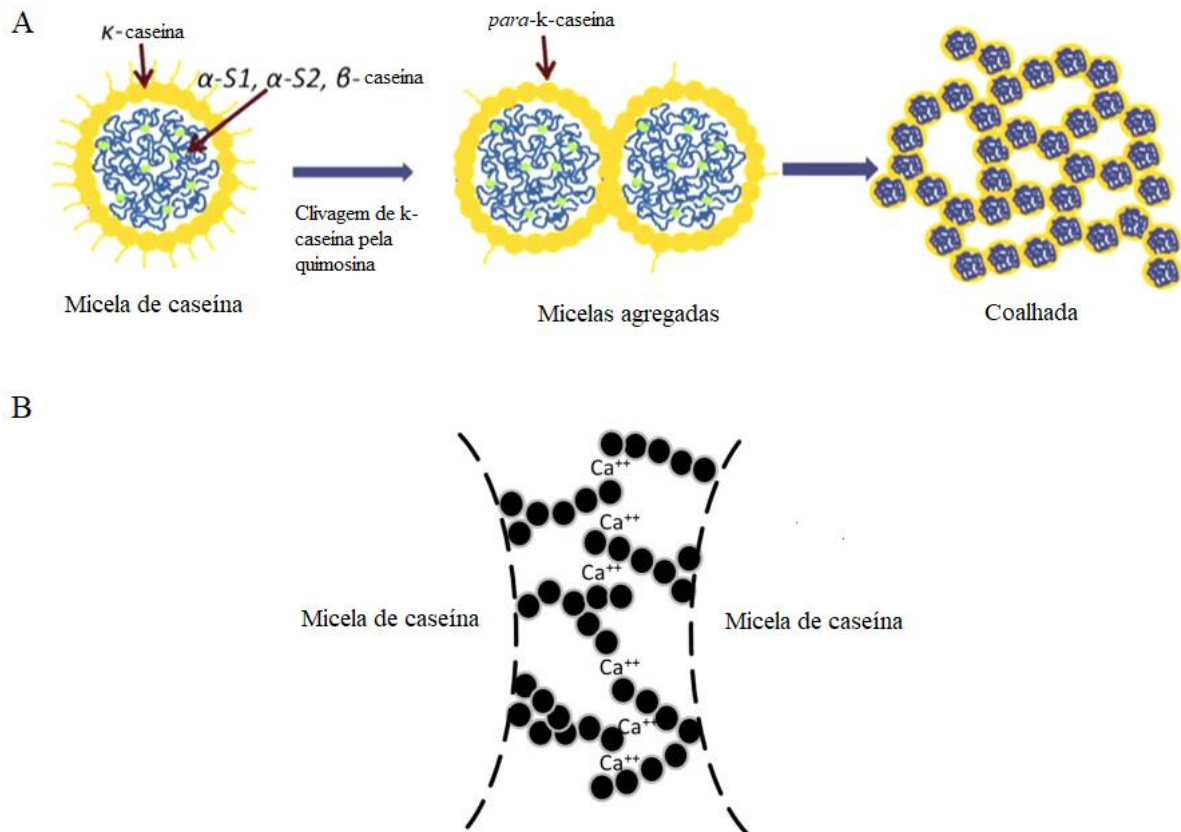
A coagulação do leite constitui-se em uma etapa fundamental na produção de queijos. Nessa, as proteases são agentes indispensáveis para promover a formação de uma coalhada e um queijo de qualidade. Brevemente, o processo envolve a clivagem de proteínas insolúveis do leite, as quais formam grandes agregados coloidais denominados de micelas de caseína (FIGURA 2). As micelas são organizadas por uma camada externa de κ -caseína, variante insensível aos íons cálcio do meio, e por um interior de caseínas sensíveis, resultando numa micela estável. Normalmente, a adição de protease provoca a hidrólise de κ -caseína, gerando um glicopeptídeo solúvel e *para*- κ -caseína. Esta última permanece insolúvel e passa a reduzir as forças repulsivas entre micelas adjacentes quando em pH neutro, condição em que apresenta carga positiva. Em seguida, influenciadas pelos íons de cálcio, as proteínas insolúveis começam a se agregar mais até a formação do coágulo (CRABBE, 2004).

A quimosina (EC 3.4.23.4) oriunda do abomaso de bezerros é tida como o coagulante mais bem estabelecido nesses processos. Entretanto, o uso dessa fonte enzimática tem sido desestimulado devido a fatores como a redução na disponibilidade de animais, crescimento dos consumidores adeptos de dietas vegetarianas e razões culturais e religiosas (JACOB; JAROS; ROHM, 2011; RICCERI; BARBAGALLO, 2016; SHAH; MIR; PARAY, 2014). Dessa forma, coalhos microbianos, recombinantes e vegetais se destacam como alternativas interessantes nos processos de manufatura de queijos.

Concentrando-se nos coagulantes vegetais, é notória a sua utilização histórica na produção de alguns tipos de queijos (O'CONNOR, 1993). Por exemplo, extratos de *Cynara sp.* são utilizados como coalhos na produção dos queijos portugueses Serra e Serpa, e dos queijos espanhóis Pedroches, La Serena, Torta del Casar, Los Ibores e Flor de Guía. Já em Nigéria e Benin, extratos de *Calotropis procera* são tradicionalmente utilizados para este fim (SHAH; MIR; PARAY, 2014).

Um parâmetro relevante na escolha de um coalho promissor, é a razão da atividade coagulante pela atividade proteolítica geral (MCA/PA). Um alto valor MCA/PA favorece a obtenção de queijos de qualidade (WEI *et al.*, 2016). Contudo, um problema comum encontrado nas proteases vegetais é a excessiva atividade proteolítica geral, a qual resulta numa razão pequena, podendo gerar queijos com sabor e textura indesejáveis. Por isso, a aplicação de moléculas de uma fonte vegetal qualquer nem sempre é viável.

Figura 2 - Representação esquemática das micelas de caseína durante a coagulação do leite na produção de queijos.



Fonte: Adaptada (BASICS..., 2017; LU *et al.* 2015).

(A) Organização das micelas de caseína. A micela de caseína é formada por um interior de caseínas α e β sensíveis ao cálcio, envoltas por uma camada externa de κ -caseína insensível. A adição de protease ao meio, representada pela quimosina, promove a clivagem da κ -caseína e a geração de *para*- κ -caseína, a qual interage com os íons cálcio permitindo a agregação de micelas adjacentes e a formação da coalhada. (B) Detalhe das pontes de íons cálcio formadas entre micelas de caseína adjacentes. As linhas pontilhadas representam a superfície das micelas de caseína.

1.3 *Morinda citrifolia* L. (noni) e seus usos industriais

Morinda citrifolia L. é amplamente conhecida no ocidente como noni ou fruta queijo, sendo algumas de suas denominações no oriente *Indian mulberry*, *nuna*, *mengkudu* e *nhaut* (CHAN-BLANCO *et al.*, 2006). Essa espécie é uma das mais conhecidas e estudadas da família Rubiaceae (RAZAFIMANDIMBISON *et al.*, 2010). Originada da Micronésia, *M. citrifolia* L. se expandiu pantropicalmente pelo globo e hoje também é encontrada em diversos estados brasileiros (CORREIA *et al.*, 2011; RAZAFIMANDIMBISON *et al.*, 2010). A figura 3 mostra os aspectos gerais da árvore e das partes dessa espécie.

Figura 3 - Aspectos gerais de *Morinda citrifolia* L. e seus frutos, flores, folhas e sementes.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O principal interesse da comunidade científica atual pelo noni advém do uso histórico de partes da planta na medicina tradicional de polinésios e havaianos (ABBOTT; SHIMAZU, 1985; MCCLATCHEY, 2002). Nesse contexto, diversas propriedades farmacológicas de compostos derivados do noni têm sido pesquisadas, principalmente de seus compostos secundários. Por exemplo, metabólitos secundários nas folhas mostraram atividade antimicrobiana (KOVENDAN *et al.*, 2014); nos frutos apresentaram ação anti-inflamatória (SANG *et al.*, 2002; YU 2004), antifúngica (ELKINS, 1998; WANG *et al.*, 1999; HONG-CAI *et al.*, 2014) e anticâncer (KAMATA *et al.*, 2006); nas raízes foram identificados potencial antioxidante e antidislipidêmico (MANDUKHAIL; AZIZ; GILANI, 2010; MOHD ZIN *et al.*, 2007). Recentemente, foi também isolada das sementes de noni a primeira molécula proteica associada a atividades analgésica e anti-inflamatória (CAMPOS *et al.*, 2016; CAMPOS *et al.*, 2017).

Contudo, a área farmacológica não é o único setor do mercado no qual essa espécie se insere, sendo as indústrias de alimentos, verde e cosméticos também relevantes

(ASSI *et al.*, 2015). Algumas das potencialidades do noni nesses mercados são listadas a seguir:

- *Conservante* – A atividade antioxidante e a presença de hidroxitolueno butilado em folhas, frutos e raízes de *M. citrifolia* taitiana promoveram ação conservante em alimentos (ZIN; ABDUL-HAMID; OSMAN, 2002).
- *Probiótico* – O suco fermentado de noni adicionado de *Bifidobacterium longum* ou *Lactobacillus plantarum* se mostrou uma bebida probiótica (WANG *et al.*, 2009).
- *Alimento funcional* – O consumo em curto prazo do suco filtrado de *M. citrifolia* ampliou a biodisponibilidade das isoflavonas de soja em ensaios com ratos *Wistar* (FALLAS-RAMIREZ; HERNANDEZ; VAILLANT, 2018).
- *Inseticida* – Extratos das folhas mostraram atividade inseticida em diferentes concentrações para os vetores de malária, dengue e filariose (KOVENDAN *et al.*, 2012).
- *Reagente químico* – Antraquinonas extraídas das raízes de noni foram utilizadas como reagentes em análise espectrofotométrica por fluxo de injeção (TONTRONG; KHONYOUNG; JAKMUNEE, 2012).
- *Suco* – O suco obtido dos frutos fermentados de noni possui comercialização bem estabelecida (ASSI *et al.*, 2015).
- *Aditivo em ração animal* – Em patente protegida mundialmente com número WO2007084983, são apresentadas formulações de *M. citrifolia* com ração animal. A invenção clama a adição de extratos de variadas partes da planta à ração visando melhorar o funcionamento fisiológico dos animais (TAHITIAN NONI INT INC, 2007).
- *Cosmético* – Formulações contendo componentes dos frutos do noni foram elaboradas para produção de protetor solar. O produto encontra-se protegido no território chinês com patente de numeração CN106214579 (CHAO *et al.*, 2016).

1.3.1 Proteases de noni

Embora a maioria dos estudos se concentre em moléculas do metabolismo secundário, a literatura traz alguns relatos de proteases extraídas dos frutos de noni (GOLDEN; SMITH-MARSHALL, 2012; ISMAIL; RAZAK, 2014). Foram analisados tanto os extratos brutos de frutos verdes e maduros (ISMAIL; RAZAK, 2014), quanto uma protease

semelhante a bromelina parcialmente purificada (GOLDEN; SMITH-MARSHALL, 2012). Em ambos os casos, não é claro a parte exata dos frutos utilizada para recuperação das peptidases analisadas. Outro ponto a ser observado é que os estudos mencionados não contemplam possíveis aplicações dessas moléculas.

Considerando as importantes funções que proteases podem desempenhar para a indústria de alimentos, em trabalho realizado no Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas da Universidade Federal do Ceará, Farias (2016) aprofundou a investigação das proteases dos frutos de *M. citrifolia* L. e mostrou sua efetiva atuação como coagulante na produção de queijo do tipo coalho. Os aspectos principais do trabalho desenvolvido por Farias são descritos abaixo:

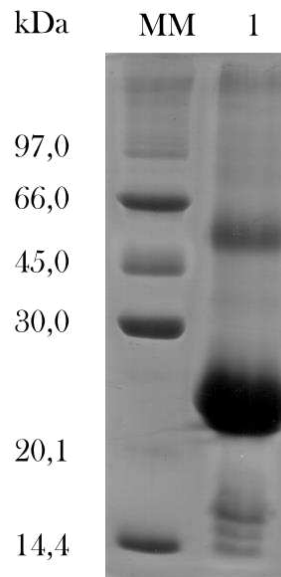
A partir do pericarpo, porção sem sementes equivalente ao purê dos frutos, foi obtido um extrato bruto denominado de extrato do purê de noni (EPN). Esse material é composto de proteínas com massas moleculares estimadas entre 53 e 15 kDa (FIGURA 4). Sua atividade proteolítica em ensaio com substrato azocaseína mostrou-se significativa, cerca de 910 U/mg/min, com valores ótimos de atividade em pH 6,0 e a 50 °C. Ressalta-se que uma unidade de atividade proteolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorvância em 0,01 a 420 nm. Além disso, uma análise de estabilidade do extrato liofilizado mostrou que 86,17% da atividade proteolítica foi mantida após 12 meses de armazenamento a -20 °C.

Ensaio com inibidores específicos mostraram que EPN é composto principalmente por proteases cisteínicas (inibição de 98%), confirmando os achados de Golden e Smith-Marshall (2012). Futuramente, esse material também mostrou perda de sua atividade proteolítica quando incubado a 50° C por 30 min, representando uma vantagem para a produção de queijos, uma vez que essas enzimas são facilmente degradadas por aquecimento após o processo de coagulação do leite, evitando a proteólise excessiva e a liberação de peptídeos que conferem sabor amargo durante a maturação dos produtos.

As proteases de EPN apresentaram atividade coagulante de leite da ordem de 238,80 U/ml, em pH 6,5 a 37 °C. Quando em presença dos inibidores de protease cisteínicas (E-64: trans-epoxisuccinil-l-leucilamido(4-guanidino)butano 0,18 mM; e iodoacetamida 0,10 mM), a coagulação do leite por EPN não ocorreu, confirmando que suas proteases cisteínicas são as responsáveis pela coagulação do leite. Sua razão SMCA/PA (1.124,31 ± 24,94), bem como perfil de hidrólise de κ -caseína, foram equiparáveis a de coalhos comerciais. Adicionalmente, foi produzido um queijo coalho com a proporção de 20 mg de proteína para cada litro de leite. Utilizando os compostos L-cisteína e cloreto de cálcio, foi possível a

chegada ao ponto de corte da coalhada em apenas 8 min de reação. O queijo apresentou aspecto e rendimento semelhantes ao controle produzido com coalho comercial, reforçando a ideia que esse coagulante vegetal é uma alternativa promissora na produção de queijos.

Figura 4 - Perfil proteico do extrato do purê de noni (EPN) em eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), condições desnaturantes e não redutoras.



Fonte: Farias (2016).

As massas do marcador são mostradas em kDa. (MM: marcador de massa molecular; 1: EPN 100 µg de proteínas. Amostra para eletroforese preparada por meio de precipitação com TCA-Acetona).

Diante dos excelentes resultados obtidos, a aplicação das proteases do purê de noni na produção de queijos foi tema de uma patente depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial em 20/01/2017 (Nº do registro BR1020170012646).

Contudo, sabe-se que o depósito de uma patente é somente o primeiro passo para a aplicação real no mercado de alimentos. Assim surgiram os questionamentos que orientaram esse trabalho:

- O extrato do purê de noni seria um ingrediente alimentar seguro?
- Em que formato esse coagulante vegetal poderia ser comercializado?
- Considerando a patente depositada, qual o cenário de inovação com o uso de proteases? E proteases vegetais?
- Quais as tendências de investimento do mercado em novos coalhos para uso na manufatura de queijos?

1.4 Objetivos gerais

Dessa forma, o presente trabalho foi organizado em duas seções principais, cada uma relacionada a um dos objetivos abaixo:

- Analisar a segurança das proteases do extrato do purê de noni como novo produto para a indústria de alimentos, especialmente no âmbito de fabricação de queijos.
- Analisar os investimentos do setor tecnológico em peptidases por meio de busca de patentes, com foco em peptidases vegetais, e suas aplicações no processo de produção de queijos.

2 SEGUNDO CAPÍTULO – COMPROVAÇÃO DA SEGURANÇA ALIMENTAR DAS PROTEASES DO PERICARPO DOS FRUTOS DE NONI

2.1 Caracterização do problema e justificativa

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) exige que novos alimentos e ingredientes alimentares tenham sua segurança de consumo confirmada antes de sua introdução no mercado. Para este fim, a ANVISA disponibiliza um guia com normas bem estabelecidas, o Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes (RESENDE *et al.*, 2013). Por definição da agência um novo alimento ou ingrediente é:

Novos alimentos ou novos ingredientes são os alimentos ou substâncias sem histórico de consumo no País, ou alimentos com substâncias já consumidas, que, entretanto, venham a ser adicionadas ou utilizadas em níveis muito superiores aos atualmente observados nos alimentos utilizados na dieta regular (ANVISA, 1999).

Sabe-se que o noni não possui histórico de consumo nas regiões brasileiras (ANVISA, 2008). Seu cultivo no país é recente, tanto que somente em 2010 foi emitido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) - Agroindústria Tropical o primeiro comunicado científico relacionado a produção de mudas dessa espécie (SOUSA *et al.*, 2010).

Junto a isso, a ANVISA também dispõe de uma resolução específica envolvendo *M. citrifolia*, a qual exige a comprovação de sua segurança como alimento. Em 2007, foram avaliados diversos relatos de caso disponíveis na literatura, os quais associaram o consumo de suco de noni a efeitos adversos à saúde, como danos ao fígado. Também se considerou que a quantidade e os tipos de estudos acerca da segurança de uso dessa espécie são insuficientes para garantir o seu consumo pela população brasileira. Consequentemente, foi proibida a utilização do noni como alimento ou ingrediente alimentar no Brasil até que os requisitos de segurança exigidos sejam atendidos e que seja feito o devido registro na agência (ANVISA, 2008).

Considerando o exposto, mesmo que as proteases do purê de noni sejam comprovadamente efetivas na produção de queijos tipo coalho (FARIAS, 2016), nem todas as informações requeridas pela ANVISA foram investigadas. Dessa forma, a primeira parte do presente trabalho concentrou-se em atender a algumas das etapas exigidas para exploração desse potente material vegetal como futuro produto alimentar.

Para isso, utilizou-se os procedimentos contidos no Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes. Resumidamente, as etapas de identificação do perigo,

caracterização do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco são recomendadas para avaliação geral do risco de um novo ingrediente. Cada sessão é composta por subtópicos que especificam as análises necessárias, como por exemplo composição centesimal, caracterização físico-química e testes de toxicidade. Essas servem de base para a elaboração de relatório técnico científico a ser encaminhado para ANVISA como parte do pedido de regulamentação de um novo produto.

Os passos desse guia específico são adequados porque as proteases do extrato do purê de noni se enquadram na categoria de novo ingrediente alimentar. E também devido a possibilidade de gerar dados que atendam às preocupações contidas no informe técnico nº 25 sobre o consumo de noni (ANVISA, 2008). Diante disso, este capítulo tem como objetivos específicos os seguintes pontos:

- Apresentar o produto alimentar e descrever a sua formulação.
- Avaliar a composição química do extrato do purê de noni.
- Investigar o padrão de digestibilidade *in vitro* do extrato do purê de noni.
- Avaliar a toxicidade subcrônica em roedores do extrato do purê de noni.

2.2 Metodologia

2.2.1 Identificação do perigo

O extrato do purê de noni foi obtido segundo descrito por Farias (2016). Brevemente, os frutos maduros foram separados das sementes com o auxílio de uma peneira para obtenção do purê. O purê fresco foi posto em contato com o tampão fosfato de sódio 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0 na proporção de 1:5 (m/v), sob agitação, durante 1 h a 4 °C. Em seguida, o extrato obtido foi filtrado, centrifugado e o sobrenadante foi dialisado contra água destilada em membrana de *cut off* 12 kDa. A etapa de diálise foi realizada com o objetivo de remover pequenos metabólitos secundários presentes nos frutos de noni, os quais conferem a esse material odor desagradável. Assim, o material dialisado apresentou-se sem odor e foi denominado de extrato do purê de noni (EPN), sendo utilizado para quantificação de proteínas (BRADFORD, 1976) e para determinação de atividade proteolítica (XAVIER-FILHO *et al.*, 1989). Por fim, EPN foi liofilizado e armazenado a -20 °C até a utilização.

Para identificação do perigo foi feita a descrição detalhada do extrato do purê de noni, incluindo sua denominação, formulação e composição química. Por se tratar de um ingrediente alimentar, também foi analisado a digestibilidade de EPN com pepsina (E.C. 3.4.23.1) *in vitro*.

O estudo da composição química do extrato do purê de noni foi realizado a partir do produto em sua forma liofilizada. As metodologias escolhidas para análise foram carboidratos totais segundo adaptação do método Dubois feita por Albalasmeh, Berhe e Ghezzehei (2013), umidade de acordo com o Instituto Adolfo Lutz (1985) e cinzas pelo guia da *Association of Official Analytical Chemists* (1996).

Em adição, foi feita a determinação do conteúdo de proteína solúvel de EPN por meio do método de Bradford (1976). Amostras do extrato liofilizado (5,8 mg cada), datadas de três períodos diferentes, foram ressuspensas separadamente em 2 ml de água destilada. As soluções obtidas foram quantificadas em triplicata.

Para simulação da digestão gástrica das proteases do purê de noni foi utilizada metodologia descrita por Sathe (1993). Foram preparados 12 ml de EPN (1,2 mg/ml) em solução de HCl 10 mM, pH 1,8, e incubados a 37 °C por 10 min. Em seguida, foi recolhida uma alíquota de 2 ml referente ao tempo 0 h e então adicionados 2,2 ml de pepsina (1,0 mg/ml), preparada em HCl 10 mM, pH 1,8, a amostra incubada. Alíquotas de 2 ml nos tempos de incubação 0,5, 1, 2, 3 e 4 h foram retiradas, misturadas com o mesmo volume de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, e então aquecidas a 100 °C durante 5 min para inativação da pepsina. Albumina sérica bovina (BSA) (1,0 mg/ml) em HCl 10 mM, pH 1,8, foi utilizada como controle, sendo alíquotas recolhidas nos tempos 0 h e 2 h. O grau de hidrólise foi avaliado através de eletroforese em gel de poliacrilamida (15 %) em condições desnaturantes e não redutoras, de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970), corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

2.2.2 Caracterização do perigo

2.2.2.1 Estudos toxicológicos: toxicidade subcrônica em roedores

Foram utilizados 30 camundongos *Swiss (Mus musculus)*, machos e fêmeas (nulíparas e não grávidas) entre 20 – 30 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, temperatura de 22 ± 3 °C, com umidade relativa de 30 – 70%, aclimatados durante cinco dias antes da realização

dos experimentos, recebendo ração e água à vontade durante todo o período de acompanhamento. Os ensaios foram realizados em conformidade com a diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA (CONCEA, 2016), e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, com o protocolo 108/17.

Para avaliação da toxicidade subcrônica de EPN foi seguido o *Guideline* 408 da OECD (1998). Os animais foram distribuídos em dois grupos, especificados abaixo, e tratados por gavagem, diariamente, durante 90 dias:

- Grupo Controle: tratado com o veículo de EPN, solução salina 0,9%; Composto por 5 machos e 5 fêmeas.
- Grupo EPN 5 mg/kg: tratado com a dose de 5 mg de proteínas de EPN por quilograma do animal, com EPN ressuspensão em solução salina 0,9%; Composto por 10 machos e 10 fêmeas.

Os camundongos foram pesados e tiveram o consumo de ração verificado a cada três dias. Adicionalmente, sinais de toxicidade como alterações em pele, pelo, olhos e membranas mucosas, ocorrência de secreções e excreções, excessivo comportamento de limpeza, mudanças na postura da marcha e resposta à manipulação foram monitorados diariamente.

No nonagésimo dia de experimento, os animais foram deixados em jejum *overnight* e no nonagésimo primeiro dia foram anestesiados com solução de xilazina-quetamina 7,5 mg/kg + 90,0 mg/kg para coleta de sangue e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. Foram coletados rins, coração, pâncreas, pulmões, fígado, intestino delgado, estômago e baço para medida do peso fresco relativo. Os exames hematológicos foram realizados utilizando analisador automático e avaliaram os níveis de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume globular médio (V.G.M.), concentração de hemoglobina globular média (C.H.G.M.), proteína total plasmática, plaquetas e leucócitos.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Identificação do perigo

2.3.1.1 Denominação do produto e formulação

O produto proposto é denominado de extrato do purê de noni (EPN) na sua forma em pó. Sua atuação como coagulante vegetal se deve ao *pool* de proteases nele contido (FARIAS, 2016).

A elaboração de uma formulação para o produto foi considerada importante para garantir que a atuação de EPN fosse ótima na coagulação de leite. Para isso, foi feita a utilização de dois coadjuvantes de tecnologia alimentar. O primeiro corresponde ao aminoácido L-cisteína, que é um agente que permite a redução do tempo de coagulação do leite. Enquanto o segundo é o cloreto de cálcio, o qual participa fornecendo os íons Ca^{2+} necessários para a conexão entre as micelas de caseína no leite, possibilitando a formação de coágulos (CRABBE, 2004). Embora íons cálcio sejam componentes naturais no leite, uma grande porção de Ca^{2+} se torna insolúvel e é precipitada durante a etapa de pasteurização. Portanto a adição de cloreto de cálcio na fabricação de queijo também é importante para restabelecer o papel desse íon na formação dos coágulos (MOUDRÁ *et al.*, 2017; NASSU; MACEDO; LIMA, 2006). Por fim, tanto a L-cisteína quanto o cloreto de cálcio são considerados seguros pela ANVISA para compor produtos alimentícios (ANVISA, 2005).

O princípio ativo do novo ingrediente são as proteases cisteínicas contidas em EPN, visto que este perde sua propriedade coagulante do leite quando as proteases estão em presença de inibidores específicos (FARIAS, 2016).

Dessa forma, o produto foi elaborado no formato de um kit contendo dois sachês (FIGURA 5). O primeiro contém L-cisteína e EPN e o segundo comporta cloreto de cálcio. As proporções do princípio ativo e dos coadjuvantes apresentadas a seguir são baseadas na informação de que cada litro de leite bovino pasteurizado gera 100 g de queijo. Para cada 100 g de queijo do tipo coalho são necessárias as seguintes quantidades dos componentes da formulação:

- I. 50 mM de CaCl_2 (5,547 g)
- II. 0,0036 g de L-cisteína + 0,020 g de proteínas de EPN liofilizado

Destaca-se ainda que são necessários 10,3 g de purê dos frutos para a obtenção de 0,02 g das proteínas de EPN.

Brevemente, o modo de uso do kit consiste em: aquecer brandamente, cerca de 40 °C, um litro de leite pasteurizado; dissolver o conteúdo do primeiro sachê no leite (FIGURA 5A); dissolver o conteúdo do segundo sachê em 3 ml de água potável, cerca de meia colher de chá (FIGURA 5B); adicionar o coagulante diluído ao leite; manter o leite em aquecimento e repouso até a formação da coalhada, a qual já pode ser observada a partir de 8 min de

coagulação. As etapas posteriores são comuns aos queijos produzidos com coagulantes enzimáticos e podem ser consultadas em Araújo *et al.* (2012).

Figura 5 - Representação dos rótulos do kit coagulante vegetal baseado no extrato do purê de noni (EPN).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Sachês elaborados para produção caseira de uma porção de 100 g de queijo. (A) Sachê contendo o coadjuvante cloreto de cálcio. Este é o primeiro a ser adicionado ao leite pasteurizado durante a manufatura do queijo. (B) Sachê contendo o coadjuvante L-cisteína e o coagulante EPN. Conteúdo a ser diluído em 3 ml de água potável com posterior adição ao leite previamente aquecido contendo cloreto de cálcio.

2.3.1.2 Composição química e digestibilidade com pepsina

O estudo dos alimentos do ponto de vista de composição química é denominado de Bromatologia. As características bromatológicas são importantes parâmetros para o acompanhamento da qualidade do produto e o fornecimento de informações sobre possíveis riscos contidos no alimento ou ingrediente. Essas análises se concentram nos componentes presentes geralmente em maior quantidade nos alimentos, como água, lipídeos, proteínas, carboidratos e minerais (BOLZAN, 2013).

O perfil de composição química de EPN é mostrado na tabela 1. Foi observado que o conteúdo de carboidratos, cinzas e umidade representa cerca de 85% do material liofilizado.

Observou-se que o componente mais abundante de EPN são os carboidratos, representando mais de 50% da massa do novo ingrediente. O fato de carboidratos

constituírem a reserva energética principal em frutos e também o modo simples de extração utilizado para obtenção de EPN, apontam a coerência do resultado encontrado (GUTIERREZ *et al.*, 1976). Esses dados também se assemelham a Correia *et al.* (2011), os quais reportam que os carboidratos são os principais constituintes da matéria seca da polpa de noni.

O conteúdo de umidade de EPN liofilizado ainda foi significativo, cerca de 10%. Enquanto o teor médio de cinzas representou 18,93%, o qual reflete a porção inorgânica e resistente a volatilização de uma amostra.

A importância das proteínas de EPN se deve ao fato de que dentre essas está presente a porção de proteases responsável pela atividade tecnológica da amostra. O conteúdo de proteínas solúveis correspondeu a 6,15% ($\pm 3,01$) da massa de EPN dissolvida. Nota-se uma variação relevante no teor de proteínas das diferentes extrações. Sabe-se que o perfil de expressão de proteínas em uma planta pode variar naturalmente dependendo das mudanças abióticas nas diferentes épocas do ano, o que pode explicar o desvio observado para EPN (ALEXANDERSSON *et al.*, 2014; CORREIA *et al.*, 2011).

Tabela 1 - Composição química do extrato do purê de noni liofilizado.

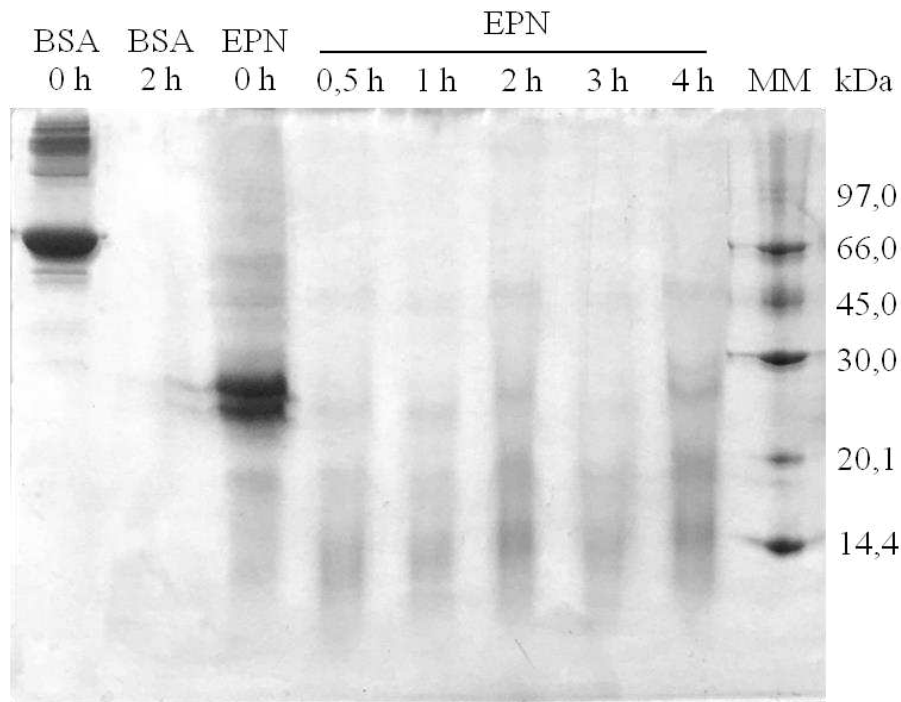
| Parâmetro | Valores (g/100g)¹ |
|---------------------|-------------------------------------|
| Carboidratos totais | 57,79 \pm 5,76 |
| Umidade | 9,95 \pm 0,76 |
| Cinzas | 18,93 \pm 0,04 |

Fonte: Elaborada pelo autor.

¹Valores referentes a relação em gramas do parâmetro analisado por cem gramas de EPN. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

Buscando analisar o padrão de processamento das proteínas de EPN após a ingestão, foi realizada simulação de digestão gástrica *in vitro*. Esse tipo de análise também se mostra interessante por indicar a presença de possíveis alérgenos proteicos, os quais são geralmente estáveis às enzimas e ao pH do estômago humano (ASTWOOD, LEACH; FUCHS, 1996). Observou-se que logo após 30 min de incubação com pepsina as bandas proteicas deixaram de ser visualizadas ou diminuem consideravelmente em intensidade, o mesmo padrão foi observado após 1, 2, 3 e 4 h de reação (FIGURA 6). A digestão do controle BSA após 2 h confirmou que a solução de pepsina utilizada se encontrava ativa. Dessa forma, mesmo que as proteínas de EPN sejam encontradas em sua forma íntegra no queijo produzido, essas moléculas são digeridas a pequenos peptídeos ou a aminoácidos ainda no estômago.

Figura 6 - Gel SDS-PAGE (15%), em condições desnaturantes e não redutoras, do ensaio de digestibilidade com pepsina das proteínas do extrato do purê de noni.



Fonte: Elaborada pelo autor.

BSA 0 h: BSA (6 μ g) íntegra; BSA 2 h: BSA (6 μ g) após 2 h incubada com pepsina; EPN 0 h: extrato da polpa de noni (27 μ g) íntegro; EPN 0,5-4 h: extrato da polpa de noni após 0,5, 1, 2, 3 e 4 h incubado com pepsina (27 μ g); MM: marcador de massa molecular.

2.3.2 Caracterização do perigo

2.3.2.1 Estudos toxicológicos: toxicidade subcrônica em roedores

Testes de toxicidade subcrônica juntamente com genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* são os mais importantes na investigação de segurança alimentar, pois a partir dos resultados obtidos é determinado se testes complementares são necessários (RESENDE *et al.*, 2013). A ANVISA recomenda a utilização de protocolos reconhecidos mundialmente para a condução da avaliação toxicológica, como os da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD). Para toxicidade subcrônica, orienta-se a utilização de modelos animais roedores e não roedores, porque a combinação de resultados possibilita uma previsão mais confiável dos possíveis efeitos em humanos. De forma a iniciar os estudos toxicológicos necessários a comprovação da segurança do extrato do purê de noni, esse trabalho se concentrou na investigação de toxicidade subcrônica em camundongos segundo orientações do *Guideline 408* da OECD (1998). Ressalta-se que somente EPN foi considerado para essa

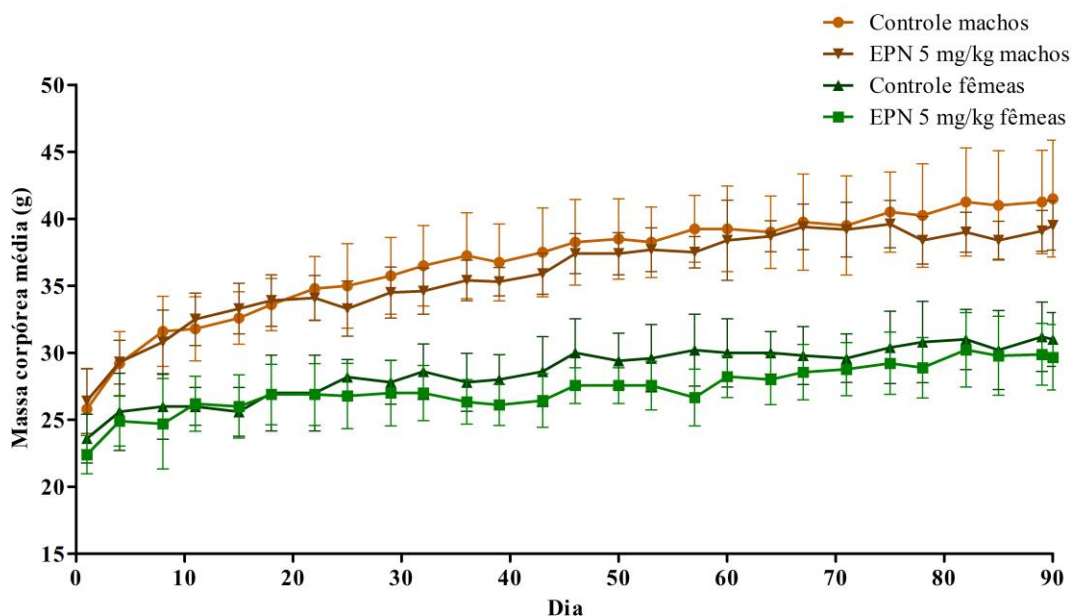
análise devido ao fato de que os outros componentes da formulação, L-cisteína e cloreto de cálcio, são considerados seguros para compor produtos alimentícios (ANVISA, 2005).

Primeiramente, as amostras utilizadas nessa análise foram padronizadas de acordo com a quantidade de proteínas de EPN, visto que as proteases coagulantes de leite se inserem nesse grupo. Em seguida, o valor inicial de 5 mg/kg para a dose foi escolhido, baseando-se no consumo médio de queijo pela população brasileira.

Previsões mostram um consumo médio de queijo *per capita* de 8 kg no Brasil, para o ano de 2017 (CARVALHO; VENTURINI; GALAN, 2015; MINTEL, 2014). Considerando isso, o valor diário médio de consumo por pessoa seria de 21,91 g de queijo. Sabendo que em 1 kg de queijo são utilizados 200 mg das proteínas de EPN, tem-se que para a média de consumo diário brasileira seriam necessários 4,38 mg dessas proteínas. Assim, um brasileiro adulto de 70 kg consumiria uma dose equivalente a 0,06 mg/kg diariamente. Diante disso, a dose de 5 mg/kg de EPN apresenta-se como cerca de 83 vezes maior do que a média de consumo diário do brasileiro.

Observando os resultados obtidos, tem-se que não ocorreu mortalidade dos animais que receberam o veículo ou o extrato do purê de noni durante os 90 dias de tratamento. Alterações em massa corpórea de machos e fêmeas tratados em comparação a seu respectivo controle (FIGURA 7), bem como alterações no padrão de consumo de ração (dados não mostrados) e mudanças em sinais clínicos, não foram observadas.

Figura 7- Variação da massa corpórea dos animais tratados na toxicidade subcrônica.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Acompanhamento da massa média dos camundongos machos e fêmeas tratados oralmente com o extrato do purê de noni ou solução salina, diariamente, durante 90 dias. EPN 5 mg/kg: animais tratados com 5 mg das proteínas de EPN por kg de massa corpórea. Controle: animais tratados com o veículo (salina 0,9%).

A determinação do peso fresco relativo dos órgãos é um importante componente nos testes de toxicidade em doses repetidas, pois pode revelar indícios de alterações órgão-específicas (SELLERS *et al.*, 2007). Na presente análise, a necropsia a olho nu dos animais não mostrou alterações nos órgãos retirados. Ao passo que o peso fresco relativo dos órgãos não mostrou diferenças do grupo tratado em relação ao controle para a maioria desses, com exceção do estômago para as fêmeas e dos intestinos delgados de machos e fêmeas (TABELA 2). Sabe-se que variações nas massas de porções gastrointestinais são comuns (SELLERS *et al.*, 2007). Ademais, a abertura dos estômagos das fêmeas, e de todos os outros animais, não revelou a presença de úlceras. Logo, as alterações observadas podem não estar associadas sinais de toxicidade. Para obter interpretações mais acuradas, são necessários os resultados de análises histopatológicas conduzidas por profissional qualificado, as quais não fizeram parte desse trabalho, mas serão conduzidas em um momento posterior.

Tabela 2 - Peso fresco relativo dos órgãos (%) dos camundongos tratados com o extrato do purê de noni 5 mg/kg.

| | Controle | | EPN 5 mg/kg | |
|-------------------|------------|-----------|-------------|------------|
| | Machos | Fêmeas | Machos | Fêmeas |
| Rins | 1,31±0,14 | 1,00±0,07 | 1,34±0,12 | 0,98±0,09 |
| Coração | 0,43±0,02 | 0,39±0,03 | 0,41±0,05 | 0,39±0,05 |
| Pâncreas | 0,40±0,04 | 0,42±0,05 | 0,37±0,07 | 0,47±0,11 |
| Pulmões | 0,43±0,02 | 0,46±0,04 | 0,47±0,04 | 0,52±0,14 |
| Fígado | 3,52±1,04 | 3,06±0,13 | 3,27±0,06 | 3,28±0,26 |
| Intestino delgado | 2,01±0,06 | 2,26±0,41 | 1,63±0,22* | 2,65±0,27* |
| Estômago | 0,55 ±0,04 | 0,75±0,06 | 0,61±0,07 | 0,86±0,07* |
| Baço | 0,14±0,01 | 0,48±0,63 | 0,17±0,04 | 0,19±0,02 |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Dados expressos como média ± desvio padrão. Teste t não pareado ($p < 0.05$). Diferenças significativas para o respectivo controle são indicadas com (*).

Os resultados das análises hematológicas são mostrados na tabela 3. Para a maioria dos parâmetros avaliados, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de machos e fêmeas e seus respectivos controles. Percebeu-se, contudo, um aumento estatisticamente significativo na concentração de hemoglobina globular média (C.H.G.M.) e

de proteína total plasmática nas fêmeas tratadas com EPN 5 mg/kg. Futuramente, a contagem diferencial de leucócitos demonstrou um padrão diferente na distribuição de segmentados e linfócitos nos animais machos que receberam o extrato.

Os níveis de C.H.G.M. relacionam a quantidade de hemoglobina em um volume de hemácias. Embora o valor médio (37,06%) para o grupo das fêmeas tratadas com EPN tenha sido maior que o das fêmeas do controle (34,94%), ambos os grupos encontram-se fora dos valores de referências para a espécie (de 30,4 a 33,0%).

Em relação a proteína total plasmática, observou-se que a média das fêmeas que receberam o extrato foi maior (5,6 g/dl) do que o seu controle, e que todos os grupos apresentaram médias inferiores aos valores de referência para camundongos (7,0 a 8,4 g/dl), incluindo os controles. Contudo, os resultados encontrados estão em acordo com o valor médio de proteína total plasmática descrito por Branco *et al.* (2011) para os camundongos *Swiss* saudáveis oriundos do biotério central da Universidade Federal do Ceará (5,8 g/dl). Portanto, a menor concentração de proteínas plasmáticas é provavelmente um fator intrínseco aos animais utilizados, não possuindo relação com sinais de toxicidade. Nota-se ainda que, nesse cenário, as fêmeas tratadas com EPN apresentam esse parâmetro dentro da normalidade.

Por fim, a distribuição de leucócitos entre neutrófilos segmentados (59,6%) e linfócitos (39,3%) nos machos (EPN 5 mg/kg) também se mostrou distinta dos padrões de referência para a espécie, os quais são de 12-38% para segmentados e 60-75% para linfócitos.

Mesmo diante das variações pontuais observadas no hemograma, não é possível relacionar esses resultados a efeitos tóxicos advindos da ingestão diária do extrato do purê de noni. Isso porque a interpretação desses dados exige que seja feita uma correlação criteriosa com os resultados de outras análises, como dados bioquímicos, avaliação histopatológica, observações clínicas e necropsia (WEISS; WARDROP, 2010, p.80). Assim, após a realização das análises bioquímicas e histopatológicas, todas as informações serão reanalisadas.

Tabela 3 - Análise hematológica dos animais tratados com EPN 5 mg/kg na toxicidade subcrônica, com contagem total e diferencial de leucócitos.

| | Controle | | EPN 5 mg/kg | |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Machos | Fêmeas | Machos | Fêmeas |
| Eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$) | 8,99 \pm 0,36 | 8,78 \pm 0,92 | 8,89 \pm 0,63 | 8,44 \pm 0,63 |
| Hemoglobina (g/dl) | 14,37 \pm 0,43 | 14,32 \pm 0,87 | 14,59 \pm 0,85 | 14,43 \pm 0,67 |
| Hematócrito (%) | 40,50 \pm 1,29 | 41,00 \pm 3,39 | 40,40 \pm 3,06 | 39,00 \pm 3,24 |
| V.G.M. (fl) | 45,00 \pm 1,51 | 46,76 \pm 1,97 | 45,42 \pm 2,05 | 46,14 \pm 2,24 |

| | | | | |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|
| C.H.G.M. (%) | 35,45±1,15 | 34,94±1,36 | 36,12±1,24 | 37,06±1,71* |
| Proteína total plasmática (g/dl) | 5,10±0,34 | 4,84±0,43 | 5,16±0,31 | 5,60±0,28* |
| Plaquetas (x10 ³ /mm ³) | 682,50±189,56 | 731,40±240,74 | 845,80±143,99 | 869,22±139,32 |
| Leucócitos (x10 ³ /mm ³) | 9,13±3,17 | 6,40±2,42 | 12,12±3,82 | 9,85±3,55 |
| Mielócitos (%) | 0±0 | 0±0 | 0±0 | 0±0 |
| Metamielócitos (%) | 0±0 | 0±0 | 0±0 | 0±0 |
| Bastões (%) | 0,25±0,50 | 0±0 | 0±0 | 0±0 |
| Segmentados (%) | 41,25±8,88 | 28,00±13,45 | 59,60±9,97* | 37,78±11,45 |
| Linfócitos (%) | 57,25±8,18 | 64,20±16,63 | 39,30±9,95* | 62,11±11,67 |
| Eosinófilos (%) | 0±0 | 0±0 | 0,10±0,31 | 0±0 |
| Basófilos (%) | 0±0 | 0±0 | 0±0 | 0±0 |
| Monócitos (%) | 1,25±0,96 | 1,60±1,51 | 1,00±1,56 | 0,11±0,33* |

Fonte: Elaborada pelo autor.

V.G.M: Volume Globular Médio. C.H.G.M.: Concentração de Hemoglobina Globular Média. Dados expressos como média ± desvio padrão. Teste t não pareado bicaudal (p < 0.05). Diferenças significativas para o respectivo controle são indicadas com (*).

A literatura traz o relato de alguns estudos de toxicidade com extratos variados dos frutos de noni. Análises de toxicidade dérmica (KHAIRULLAH *et al.*, 2014), prenatal (WEST; SU; JENSEN, 2008), reprodutiva (MULLER *et al.*, 2009), subcrônica oral (HADIJAH; NORMAH; TARMIZI, 2008; ROSLY *et al.*, 2011; WEST; SU; JENSEN, 2009), aguda oral (HADIJAH *et al.*, 2003) e crônica oral (SHALAN; MUSTAPHA; MOHAMED, 2017) em animais são encontradas. Contudo, destaca-se que nenhum desses estudos padroniza as doses escolhidas pela quantidade de proteínas solúveis no material, diferentemente do estudo com EPN. Podendo essa ser feita pelo conteúdo de polissacarídeos (MULLER *et al.*, 2009), pelo peso do material bruto após secagem (ROSLY *et al.*, 2011) ou por diluição do purê do fruto (HADIJAH; NORMAH; TARMIZI, 2008; WEST; SU; JENSEN, 2009). Além disso, o material de análise não é processado como no presente trabalho, visto que as publicações utilizam altas temperaturas para obtenção de suas amostras e nenhum realiza etapa de diálise. Os resultados observados também se mostram distintos, com alguns extratos não provocando alterações nos parâmetros observados (KHAIRULLAH *et al.*, 2014; ROSLY *et al.*, 2011; WEST; SU; JENSEN, 2009; WEST; SU; JENSEN, 2008) e outros apresentando mudanças (HADIJAH; NORMAH; TARMIZI, 2008; MULLER *et al.*, 2009). Dessa forma, o estudo de toxicidade realizado com EPN mostra-se como um trabalho relevante em complemento às análises semelhantes existentes sobre os frutos de noni.

2.4 Conclusões

Como esperado de um extrato aquoso de frutos, o componente mais abundante no produto foram os carboidratos. As proteínas do extrato do purê de noni foram tomadas como base para as análises realizadas por representarem a porção em que o princípio ativo para coagulação de leite está contido. A toxicidade subcrônica inicialmente não indicou anormalidades na dose avaliada. De modo complementar, a análise das proteínas de EPN mostrou que essas são susceptíveis a digestão com pepsina, indicando a ausência de proteínas alergênicas e a digestão das proteases ainda no estômago dos animais. Considerando também as orientações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, outras doses precisam ser realizadas para possibilitar a visualização de efeitos dose resposta.

3 TERCEIRO CAPÍTULO – PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE PATENTES RELATIVAS A PROTEASES NA PRODUÇÃO DE QUEIJOS

3.1 Caracterização do problema e justificativa

A prospecção tecnológica consiste num amplo conjunto de estratégias que objetivam gerar informações para avaliar o desenvolvimento de uma área, identificando problemas, possibilidades e pontos futuros de inovação (AMPARO; RIBEIRO; GUARIEIRO, 2012; MAYERHOFF, 2008). Esse desenvolvimento engloba tanto produções científicas quanto tecnológicas (KUPFER; TIGRE, 2004). Os resultados que advêm desses estudos podem ser importantes influenciadores em empresas e, também, na criação de políticas públicas pelos governos (OLIVEIRA; QUENTAL, 2012).

Como exemplos de estudos prospectivos abrangentes é possível citar os projetos “PROSPECTAR”, organizado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia brasileiro no ano 2000 e considerado o primeiro estudo prospectivo nacional (OLIVEIRA; QUENTAL, 2012), e o “Rotas Estratégicas Setoriais” conduzido pela Federação das Indústrias do Estado do Ceará (FIEC) em 2015, voltado para o estado cearense (FIEC, 2016). Ambos reuniram profissionais do setor acadêmico, industrial, governo e grupos de pesquisa para discutir sobre pontos considerados estratégicos no desenvolvimento do país, apontando possibilidades de crescimento futuro.

Além dos valiosos resultados desses debates, as prospecções geralmente são complementadas com levantamento de outros dados relevantes sobre o tema em questão. Por exemplo, informações de mercado, pesquisa, desenvolvimento e inovação, podendo este último ser acessado por meio de análise de patentes.

As informações agregadas em patentes geram coleções atualizadas e de qualidade sobre novas tecnologias e inovações (HONG, 2004). Com isso é possível avaliar os rumos do mercado em análise, assim como os tipos de inventores e as principais regiões de origem e concentração de investimento tecnológico.

Diante do exposto e do tema do presente trabalho, considerou-se relevante investigar qual investimento tem sido feito pelo setor tecnológico de inovação em peptidases, com atenção especial para peptidases vegetais, e suas aplicações no processo de produção de queijos. Para isso, a análise de patentes foi escolhida como estratégia. Assim, esse capítulo conta com os seguintes objetivos específicos:

- Investigar o estado da arte da produção tecnológica mundial e brasileira acerca de proteases e proteases vegetais, em especial, no setor alimentício.
- Avaliar o perfil dos principais depositantes de patentes.
- Analisar o caráter inovador do uso das proteases do extrato do purê de noni na produção de queijo a nível mundial e nacional.
- Analisar a tendência do mercado em absorver novos coagulantes para produção de queijos.

3.2 Metodologia

As buscas por patentes foram conduzidas em dois bancos de dados, um mundial e outro nacional, no período entre 07 e 18 de outubro de 2017. Para avaliação do cenário global foi escolhida a coleção mundial do *European Patent Office* (EPO), por meio da ferramenta de busca *Espacenet*. Enquanto que o panorama nacional foi avaliado com buscas na plataforma online do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI).

Para cada plataforma, foram realizados dois tipos de buscas. Um geral, com foco em proteases e proteases vegetais, e um específico, concentrado em proteases e proteases vegetais aplicados na tecnologia de fabricação de queijos. Para todas as pesquisas foram utilizados caracteres de truncagem, visando abranger variações das palavras-chave, operadores booleanos para a combinação adequada dos termos de busca, e filtros para a data de publicação - intervalo de 20 anos compreendido entre 01 janeiro de 1997 até 08 de outubro de 2017 - e para Classificação Internacional de Patentes (IPC) - A23 ou C12.

3.2.1 Buscas gerais: proteases e proteases vegetais

Na plataforma *Espacenet*, disponível em <<https://worldwide.espacenet.com/>>, foi selecionada a aba de busca avançada, sendo escolhida a opção “*Worldwide - collection of published application from 100+ countries*”, e as seguintes palavras-chave foram digitadas no campo “título ou resumo”, acompanhadas dos filtros especificados anteriormente:

- *(protease# OR peptidase#)*
- *((protease# OR peptidase#) AND plant)*

Na base de dados do INPI para busca de patentes, disponível em <<https://gru.inpi.gov.br/pePI/jsp/patentes/PatenteSearchBasico.jsp>>, foi selecionada a opção

busca avançada e inseridos os filtros previamente descritos. No campo “resumo” foram escritas as palavras-chave no seguinte formato:

- (protease* OR peptidase*)
- (protease* OR peptidase*) AND (vegeta*)

3.2.2 Buscas específicas: proteases e proteases vegetais aplicadas na tecnologia de fabricação de queijos

Para recuperar os dados referentes à aplicação de proteases na tecnologia de fabricação de queijos, a estratégia utilizada consistiu na combinação de sinônimos de protease com algum outro termo relacionado à palavra queijo. Foram seguidos os mesmos passos e filtros das buscas gerais no sítio *Espacenet*, sendo escolhido um dos seguintes termos adicionais: *rennet*, *cheese#*, *milk clotting*, *dairy* ou *food industry*; e INPI, com os termos adicionais equivalentes: coalho, queijo*, coagulante leite, laticínio* ou indústria de alimentos.

Combinações de palavras-chave utilizadas no *Espacenet*:

- (enzyme# OR protease# OR peptidase#) AND (termo adicional)
- (enzyme# OR protease# OR peptidase#) AND (plant#) AND (termo adicional)

O termo “enzima” foi adicionado como sinônimo extra de protease nessa etapa por se tratar de uma pesquisa mais restrita, fator que reduz o número de resultados não relacionados com o escopo da busca. Em função de a plataforma INPI permitir apenas a combinação de quatro palavras-chave por vez, foram realizadas buscas separadas com os termos enzima*, protease* e peptidase* em combinação com as outras palavras.

Combinações de palavras-chave utilizadas no INPI:

- (enzima*/protease*/peptidase*) AND (termo adicional)
- (enzima*/protease*/peptidase*) AND (vegeta*) AND (termo adicional)

Os resumos de cada patente recuperada foram analisados, sendo os resultados repetidos e não relacionados com a tecnologia de fabricação de queijos desconsiderados.

3.3 Resultados e Discussão

Existem várias maneiras de se obter informações sobre as patentes depositadas em uma jurisdição. Uma opção é a consulta no órgão nacional de um país. Geralmente, as nações possuem um departamento para o registro de patentes em seu território, cada uma possuindo regras e procedimentos específicos. Alguns países contam com plataformas digitais que

promovem o livre acesso às patentes neles depositadas, tal como ocorre no Brasil. Enquanto outros apenas permitem consultas via solicitação, disponibilizam listas mensais *online* ou possuem revistas de patentes para compra, como Uruguai, Bolívia e Grécia, respectivamente (PATENT..., 2017). Outra alternativa é a busca de patentes em bases de dados mundiais desenvolvidas por agências como *World Intellectual Property Organisation* (WIPO) e *European Patent Office* (EPO). No WIPO, por meio da ferramenta *Patentscope*, são fornecidos dados de coleções de variadas nações, as quais totalizavam quase 66 milhões de patentes até 25 de outubro de 2017 (WIPO, 2017). Já a ferramenta *Espacenet* desenvolvida pelo EPO contém uma coleção mundial de patentes com informação de mais de 100 países, totalizando mais de 100 milhões de patentes até 28 de outubro de 2017 (EUROPEAN OFFICE, 2017). Portanto, para buscas em jurisdições específicas seria mais apropriada a consulta na respectiva agência nacional e para o levantamento de dados sobre o estado da arte de uma tecnologia mundialmente, *Patentscope* e *Espacenet* se mostram como bases de busca valiosas.

No presente trabalho, a plataforma do INPI foi utilizada para recuperação de dados dos depósitos de patentes feitos no Brasil. Adicionalmente, os dados mundiais de patentes foram obtidos por meio da ferramenta *Espacenet*, devido a boa abrangência e acessibilidade dessa plataforma, a qual permite ao usuário a exportação dos resultados obtidos para uma análise mais efetiva.

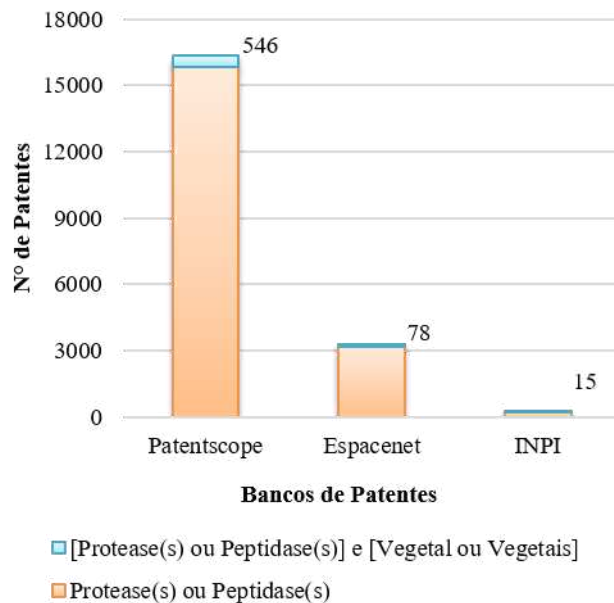
Após a definição dos bancos de dados apropriados, a escolha de critérios de busca é fundamental, pois diferentes resultados podem ser obtidos devidos aos variados modos de delineamento. Alguns dos filtros disponíveis aplicados nesta prospecção de patentes foram: intervalo temporal, palavras-chave e numeração na Classificação Internacional de Patentes (IPC). Primeiramente, escolheu-se o intervalo de 20 anos, a contar da data da primeira publicação, para a contemplação de patentes majoritariamente ativas. Posteriormente, as palavras-chave foram escolhidas com base no tema da pesquisa, considerando também os seus sinônimos comuns. Finalmente, a definição do IPC mostrou-se interessante, uma vez que esse agrupa cada patente em temas específicos padronizados internacionalmente, possibilitando a realização de pesquisas mais acuradas. Diante disso, foram escolhidos os IPCs A23 (alimentos ou relativos a alimentos; seu tratamento, não coberto por outras classes), da grande área A de Necessidades Humanas, e C12 (bioquímica; cerveja; bebidas destiladas; vinho; vinagre; microbiologia; enzimologia; mutação ou engenharia genética), da categoria C de Química e Metalurgia (IPC PUBLICATION, 2017).

3.3.1 Buscas gerais

Ao todo foram encontradas 3.181 patentes no *Espacenet* e 221 no INPI na busca por proteases. Adicionalmente, incluíram-se os resultados dos mesmos tipos de pesquisa realizados no *Patentscope*, o qual resultou em 15.823 processos. Para proteases vegetais, foram encontrados números de processos consideravelmente menores, sendo 78, 15 e 546 em *Espacenet*, INPI e *Patentscope*, respectivamente (FIGURA 8). O grande número de processos incluindo proteases indica o interesse mundial na aplicação tecnológica dessas enzimas, ao passo que a pequena quantidade de patentes envolvendo proteases de plantas revela que há espaço a ser explorado pelas fontes vegetais.

Muito embora o volume de informações obtido tenha sido bem mais expressivo no repositório do WIPO, essa plataforma não se mostrou prática para o armazenamento e estudo dos dados. Isso porque, diferentemente do *Espacenet*, a plataforma *Patentscope* ainda não possui ferramentas que possibilitem a exportação dos resultados encontrados. Sendo assim, para as análises posteriores foram somente consideradas as bases de *Espacenet* e INPI.

Figura 8 - Resultados das buscas gerais de patentes acerca de proteases e proteases vegetais em coleções mundiais de patentes e no banco de dados brasileiro.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Em azul e em laranja tem-se as palavras-chave utilizadas nas buscas em seu formato em português, utilizadas no repositório do INPI. Para as buscas nas coleções mundiais de *Patentscope* e *Espacenet*, foram utilizados termos equivalentes na língua inglesa. Os números em destaque correspondem a

quantidade de patentes relacionadas à proteases vegetais (barra azul) em cada uma das bases de dados.

3.3.1.1 Buscas gerais no Espacenet

No tema proteases, foram analisados os 500 primeiros resultados obtidos no *Espacenet* ordenados por data de publicação, com a última publicação datando de março de 2012. As patentes foram organizadas de acordo com a jurisdição em que se encontravam protegidas (FIGURA 9A) e com os dez depositantes com maior quantidade de patentes (FIGURA 9B).

A distribuição por jurisdição de proteção indica a dimensão da atratividade dos territórios para os investidores em tecnologia. Nota-se que somente em China e Estados Unidos estão protegidas mais da metade das tecnologias encontradas.

O mercado chinês tem sofrido uma expansão dramática nos seus depósitos nacionais de patentes, tanto por depositantes chineses quanto por estrangeiros, desde que elaborou sua primeira legislação em patentes no ano de 1986. Desde então, a sua lei de patentes passou por algumas emendas, e a taxa de crescimento anual de depósitos alcançou o patamar de 23% (HU; JEFFERSON, 2009; LI, 2012). Sabendo disso, o interesse na proteção das inovações envolvendo proteases no território chinês pode ser explicado.

Por sua vez, os Estados Unidos figuram como um dos maiores mercados da atualidade, atrás apenas da China.

Outras das patentes encontram-se protegidas em 19 nações, distribuídas em Ásia, Oceania, Europa, América Central e do Norte e África do Sul. Aparentemente, a América Latina não parece ser muito atrativa a aplicações com peptidases.

Dentre as patentes recuperadas, observa-se ainda que algumas foram protegidas por meio de tratados internacionais. Trinta e oito processos, marcados como WIPO, estão protegidos internacionalmente por meio do tratado *Patent Cooperation Treaty* (PCT), o qual atualmente conta com a participação de 152 nações (PCT..., 2017). Enquanto outros 14, denominadas de EPO, foram protegidos sob a convenção regional *European Patent Convention* (EPC), a qual conta com 39 estados europeus (MEMBER..., 2017).

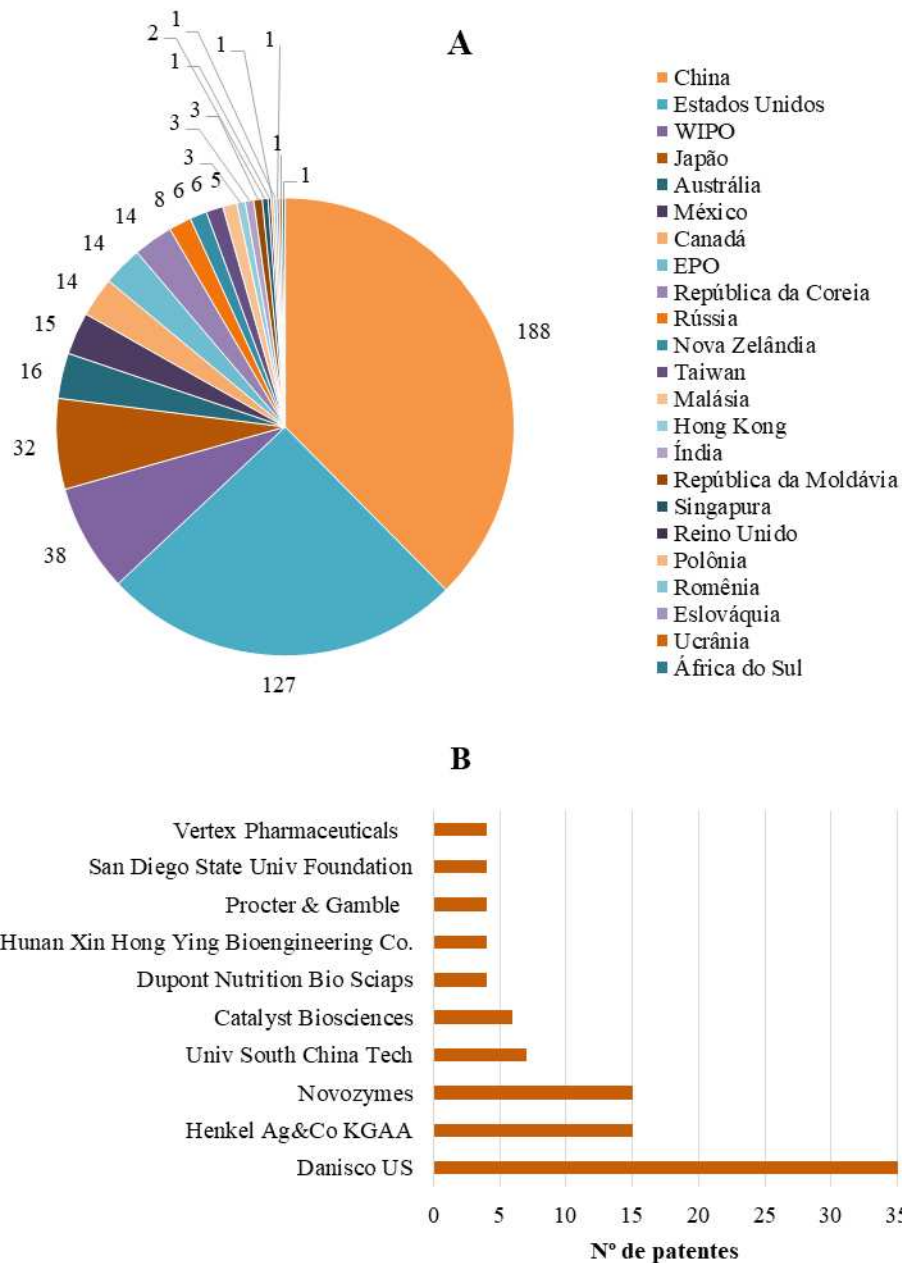
Os depositantes de patentes podem ser empresas públicas ou privadas, governos, universidades, centros de pesquisas e indivíduos (HONG, 2004). No tópico de proteases, 60,2% dos depósitos partiram de empresas, 23,8% de universidades e 16% de institutos de pesquisa ou pessoas físicas. O grande número de empresas mostra o interesse dessas em explorar o potencial inovador advindo do uso de peptidases. Em adição, a participação de

universidades, embora menor, ainda é significativa. Isso indica o empenho da academia para a transformação do conhecimento em produtos que possam de fato atingir o mercado.

Em relação aos principais depositantes, a empresa estadunidense Danisco do setor alimentício, pertencente ao grupo DuPont, apresenta investimento considerável no potencial tecnológico de proteases, sugerindo a importância dessas moléculas nesse setor. O grupo DuPont é um dos maiores participantes no mercado global de enzimas (PANDEY *et al.*, 2017).

Uma vez que, inicialmente, o Brasil não foi identificado como jurisdição de proteção, foi verificado se este seria encontrado como depositante por meio de análise dos números de prioridade. Constatou-se então a existência de um depósito via PCT pela empresa Cristália produtos químicos e farmacêuticos LTDA. Datada de maio de 2012 e com número de publicação WO 2013/177647, a patente tem como título “Meio de cultura para bactérias do gênero *Clostridium* livre de componentes de origem animal e processo para produção de sobrenadante contendo uma ou mais proteases com atividade colagenolítica e gelatinolítica”. A referida patente tem como principais áreas de aplicação a microbiologia e a biotecnologia, sendo seu foco a produção de um meio de cultura favorável a recuperação de proteases. Esse exemplo mostra que as patentes encontradas podem ser relacionadas a proteases de modo indireto, ou seja, essas moléculas não fariam parte da inovação em si, mas seriam beneficiadas pela nova tecnologia.

Figura 9 - Divisão das 500 primeiras patentes recuperadas no *Espacenet* com a busca geral por **proteases**.



Fonte: Elaborada pelo autor.

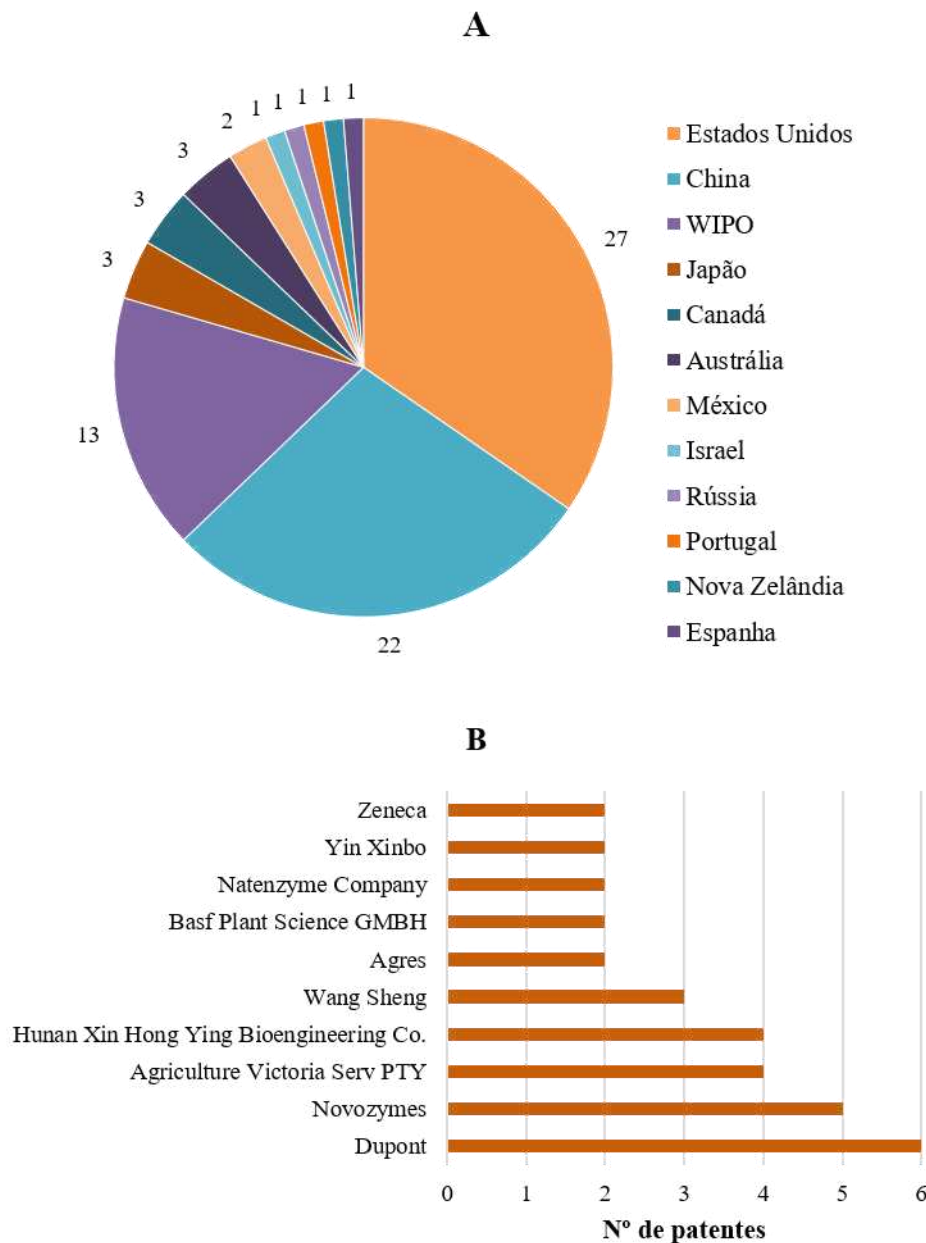
(A) Jurisdição de proteção, ou seja, local em que a patente se encontra protegida. Os países listados estão ordenados em sentido horário no gráfico, começando do maior número de patentes encontrado para o menor. A China é a primeira região representada, contando com 188 patentes. (B) Dez principais depositantes. Os números indicam a quantidade de patentes encontradas.

Por sua vez, a pesquisa acerca de proteases vegetais também teve todos os resultados analisados quanto à jurisdição de proteção e depositantes. Semelhante ao cenário das proteases, Estados Unidos e China são os principais mercados de proteção, seguidos das patentes protegidas mundialmente via PCT (FIGURA 10A).

Novamente, a maior porção das patentes é originada em empresas (67,9%), com participação de fundações de pesquisa ou pessoas físicas (19,3%) e universidades (12,8%).

Embora a empresa DuPont apareça liderando o ranking de depositantes nessa categoria, a companhia conta somente com 6 patentes, o que demonstra que as patentes recuperadas se encontram distribuídas entre variados depositantes (FIGURA 10B).

Figura 10 - Divisão das patentes recuperadas no *Espacenet* com a busca geral por **proteases vegetais**.



Fonte: Elaborada pelo autor.

(A) Jurisdição de proteção, ou seja, local em que a patente se encontra protegida. Os países listados estão ordenados em sentido horário no gráfico, começando do maior número de patentes encontrado para o menor. Os Estados Unidos é a primeira região representada, contando com 27 patentes. (B) Dez principais depositantes. Os números indicam a quantidade de patentes encontradas.

3.3.1.2 Buscas gerais no INPI

Ainda que o Brasil não tenha se mostrado uma jurisdição atrativa para proteção nas buscas no *Espacenet*, sabe-se que as patentes depositadas via PCT também possibilitam a proteção das tecnologias no território brasileiro, visto que este é um país associado. Para confirmação disso, as buscas gerais na plataforma do INPI forneceram informações mais precisas sobre o interesse dos depositantes em proteger tecnologias no Brasil.

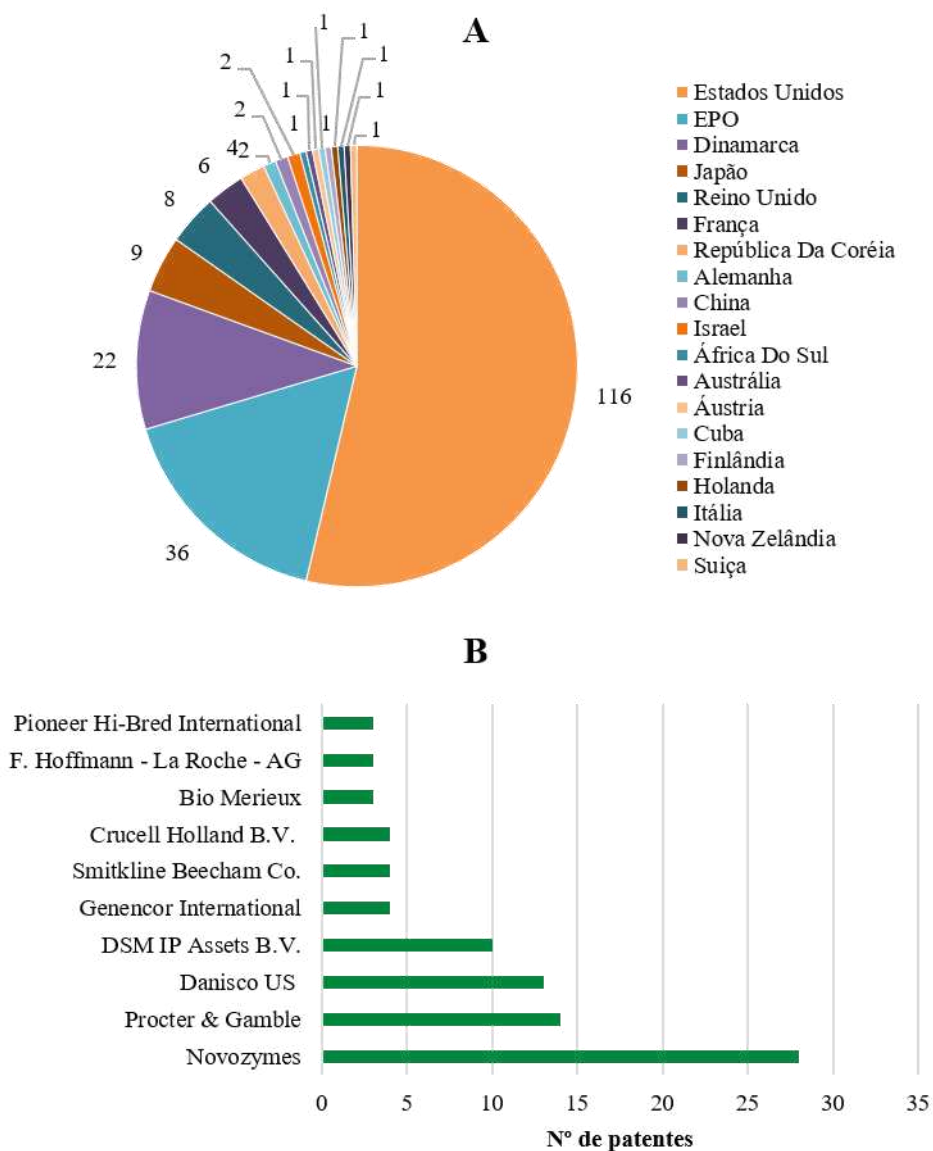
Os resultados das buscas no INPI com as palavras-chave proteases e proteases vegetais são apresentados nas figuras 11 e 12. Mais da metade das patentes depositadas no Brasil sobre proteases são originadas dos Estados Unidos. Sendo os próximos depositantes expressivos o EPO e a Dinamarca, esse último principalmente devido a empresa Novozymes (FIGURA 11A). Curiosamente, nenhuma patente de origem brasileira foi encontrada no banco do INPI no tema da presente pesquisa. Fenômeno semelhante foi observado em levantamento feito pela Federação das Indústrias do Estado do Ceará acerca das patentes depositadas no Brasil no tema de Biotecnologia, onde a origem dos depósitos era internacional com WIPO, EPO e Estados Unidos como depositantes principais (FIEC, 2016). Sabe-se que esse tipo de fenômeno em nada se relaciona a falta de profissionais qualificados, pois um número considerável de mestres e doutores é formado anualmente com especialização em enzimas (DAIHA *et al.*, 2016).

Dessa forma, uma possível explicação para a ausência de depósitos brasileiros é que os depositantes brasileiros podem estar concentrando sua contribuição na geração de conhecimento através de artigos científicos. Dados do Senado Federal mostram que o Brasil participa com 2,4% da produção científica mundial, enquanto que as solicitações de patentes somam somente 0,2% da produção tecnológica global (EM DISCUSSÃO!..., 2012). Outra opção é a escolha de proteger a informação tecnológica por meio de segredos industriais (HONG, 2004).

Assim como na plataforma *Espacenet*, os depositantes são majoritariamente empresas (88,2%), com alguma participação de fundações de pesquisa ou pessoas físicas (7,3%) e universidades (4,5%). Nota-se que a participação de universidades é muito menos expressiva. Por se tratarem de instituições estrangeiras, é possível que o custo envolvido no processo de proteção tecnológica não compense a proteção fora do seu território de origem. Para empresas isso não seria um problema, pois estas, principalmente as multinacionais, possuem filiais em diversos países.

A principal empresa depositante, com 28 patentes, é a Novozymes (FIGURA 11B). Novozymes é uma multinacional dinamarquesa especializada no desenvolvimento de tecnologias enzimáticas, a qual atualmente lidera o mercado mundial de enzimas (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2017; PANDEY *et al.*, 2017). Em 2011, foram inaugurados laboratórios de pesquisa e desenvolvimento no Paraná, Brasil (NOVOZYMES..., 2011). Com isso, pode-se entender o interesse desta companhia em proteger suas invenções também no território brasileiro.

Figura 11 - Divisão das patentes recuperadas no INPI com a busca geral por **proteases**.



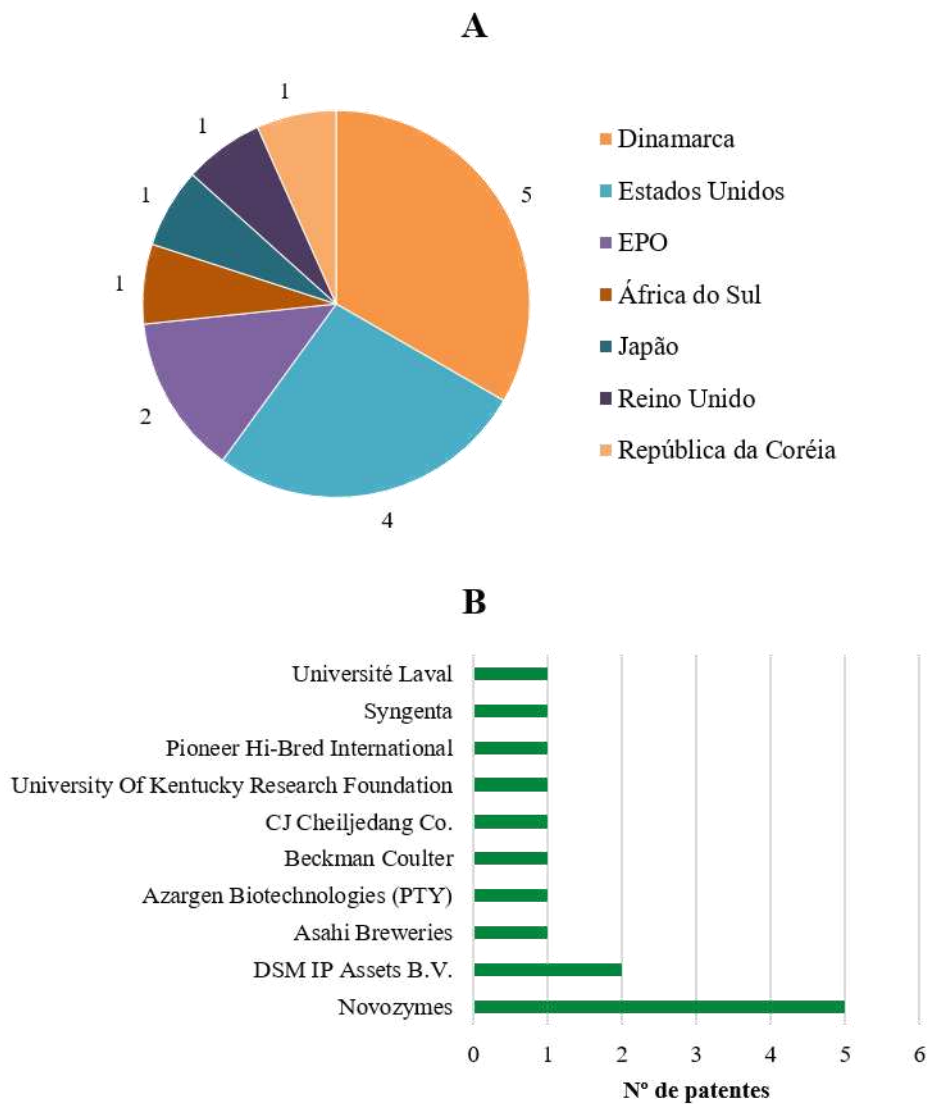
Fonte: Elaborada pelo autor.

(A) Região de origem de proteção. Os países listados estão ordenados em sentido horário no gráfico, começando do maior número de patentes depositado para o menor. Os Estados Unidos é o principal depositante encontrado,

contando com 116 patentes. (B) Dez principais depositantes. Os números indicam a quantidade de patentes encontradas.

As poucas patentes com utilização de proteases vegetais no INPI são oriundas de sete regiões (FIGURA 12A), sendo um terço delas advindas da Dinamarca por meio da multinacional Novozymes (FIGURA 12B). Somente dois dos depositantes são universidades. Considerando os resultados anteriores que mostram o significativo interesse em proteases, vê-se que o potencial das proteases vegetais é ainda pouco explorado mundialmente.

Figura 12 - Divisão das patentes recuperadas no INPI com a busca geral por **proteases vegetais**.



Fonte: Elaborada pelo autor.

(A) Região de origem de prote o. Os países listados estão ordenados em sentido horário no gráfico, começando do maior número de patentes depositado para o menor. A Dinamarca é o principal depositante encontrado, contando com 5 patentes. (B) Depositantes. Os números indicam a quantidade de patentes encontradas.

3.3.2 Buscas específicas

Nessa etapa foram procuradas patentes específicas de proteases aplicadas no processo de fabricação de queijos nas bases *Espacenet* e INPI. Após análise de títulos e resumos, foram excluídos os resultados repetidos e considerados somente os pertencentes ao escopo da pesquisa. Os resultados encontrados com a combinação das palavras-chave escolhidas antes da aplicação dos critérios de exclusão mencionados são apresentados no quadro 2. Ao todo foram obtidos 690 resultados no banco de dados mundial com a busca por proteases, contudo foram recuperadas apenas 18 patentes no escopo da pesquisa. Para proteases vegetais, de 32 resultados obtidos, três foram recuperados. Já na plataforma brasileira, dos 10 processos de patente encontrados envolvendo proteases, somente um está realmente relacionado com a produção de queijos. Para proteases vegetais não foram encontrados resultados.

Quadro 2 - Resultados das buscas por patentes de proteases e proteases vegetais aplicadas na fabricação de queijos antes da exclusão de documentos não relacionados ao escopo da pesquisa.

| | <i>rennet/ coalho</i> | <i>cheese# /queijo*</i> | <i>milk clotting/ coagulante leite</i> | <i>dairy/ laticínio*</i> | <i>food industry /indústria de alimentos</i> |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--|---------------------------------|--|
| <i>protease#/ protease*</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 0</i> | INPI: 1 <i>Espacenet: 0</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 2</i> | INPI: 1 <i>Espacenet: 1</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 16</i> |
| <i>peptidase#/ peptidase*</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 0</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 0</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 0</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 0</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 4</i> |
| <i>enzyme# /enzima*</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 8</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 8</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 12</i> | INPI: 7 <i>Espacenet: 53</i> | INPI: 1 <i>Espacenet: 586</i> |
| <i>plant# protease#/ protease* vegeta*</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 0</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 0</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 1</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 0</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 0</i> |
| <i>plant# peptidase#/ peptidase* vegeta*</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 0</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 0</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 0</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 0</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 0</i> |
| <i>plant# enzyme#/ enzima* vegeta*</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 1</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 1</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 1</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 4</i> | INPI: 0 <i>Espacenet: 24</i> |

Fonte: Elaborada pelo autor.

São apresentados os termos chave utilizados para as buscas em inglês e português, acompanhados dos operadores de truncagem das bases de dados *Espacenet* (#) e INPI (*). #: usado para palavras com grafias um caractere de diferença. *: usado para substituir um conjunto de caracteres. Nas áreas de cor cinza tem-se os

termos relacionados à produção de queijo; nas de cor verde os relacionados a proteases; e em lilás os relacionados a proteases vegetais. O número de patentes encontradas em cada base de dados com as combinações realizadas é mostrado na região central do quadro.

Dos processos recuperados pelo Espacenet, os Estados Unidos aparecem mais uma vez como principal região de proteção (FIGURA 13A), sendo variados os países de origem das patentes com proteases na produção de queijos. Das três patentes utilizando proteases vegetais, duas são protegidas via PCT e uma é protegida na Espanha (QUADRO 3). Seus países de origem, de acordo com o número de prioridade, são Portugal e Espanha. O interesse dessas nações em inovação no uso de coagulantes de fonte vegetal pode ser relacionado ao uso histórico de extratos de plantas na produção de vários de seus queijos tradicionais (O'CONNOR, 1993).

Quadro 3 - Patentes recuperadas no *Espacenet* na busca por proteases vegetais na produção de queijo.

| Título | Jurisdição de proteção | País de origem do depósito | Depositante |
|--|------------------------|----------------------------|---|
| Produção por leveduras de proteases aspárticas originadas de plantas com atividade proteolítica e coagulante em leites de ovelha, vaca e cabra | Mundial via PCT | Portugal | Instituto de Cinema Aplicada e Tecnologia |
| Proteases aspárticas | Mundial via PCT | Portugal | Biocant Associação de Transferência Tecnológica |
| Coagulante vegetal em pó e sua aplicação na produção de queijos | Espanha | Espanha | Universidade de Cordoba |

Fonte: Elaborada pelo autor.

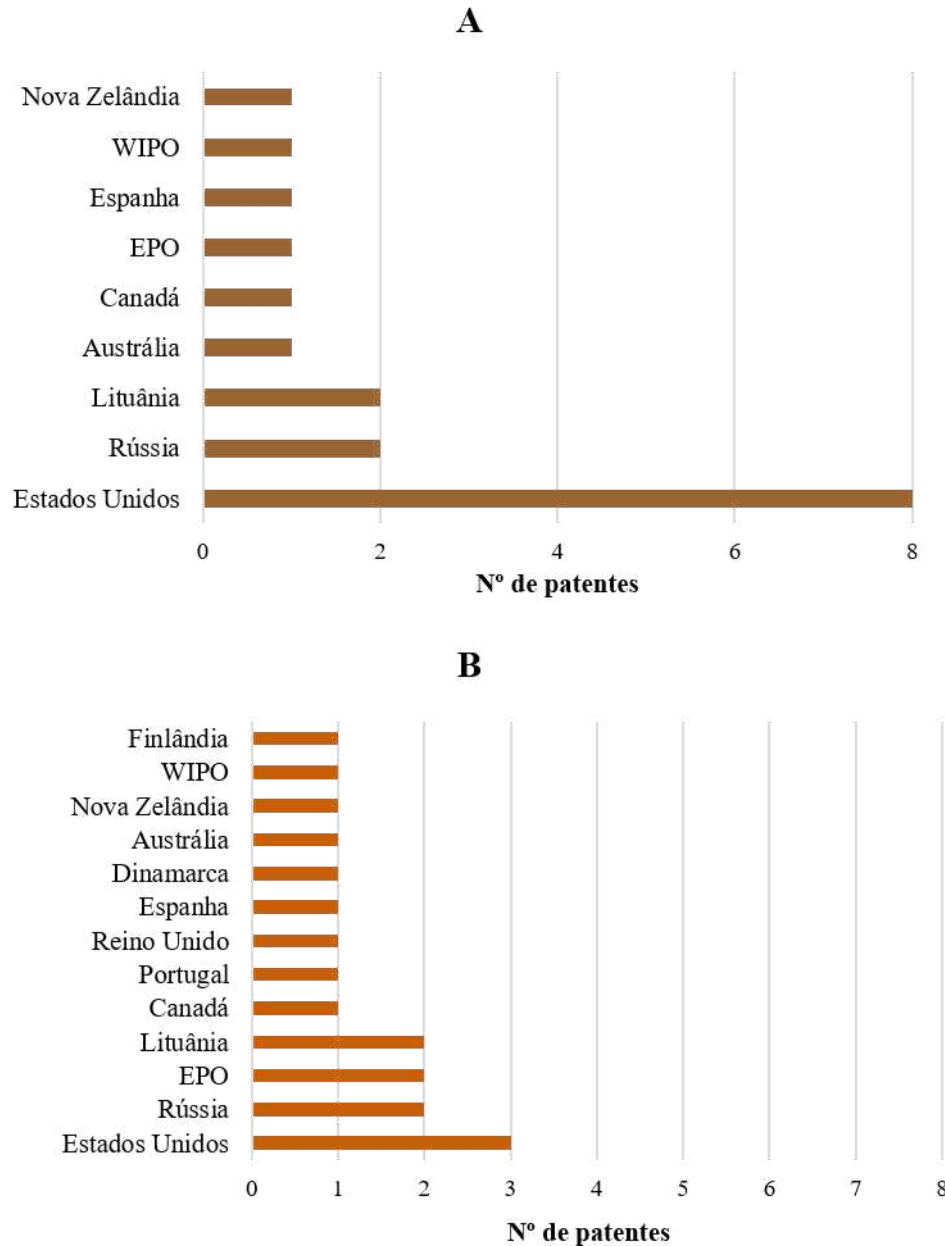
Jurisdição de proteção é o local em que a patente se encontra protegida. PCT: *Patent Cooperation Treaty*, tratado que possibilita a proteção mundial de patentes via um único processo.

O documento encontrado no INPI refere-se a uma formulação líquida contendo uma peptidase aspártica do fungo *Rhizomucor miehei*, amplamente utilizado no preparo de coalho microbiano, e sua aplicação na manufatura de queijo. Como já esperado, a patente é de origem estrangeira. Seu número de identificação é PI 0709829-4, e o depósito foi efetivado pela companhia europeia DSM IP Assets B.V. via tratado internacional.

Percebe-se que a patente depositada pelo grupo de pesquisa deste trabalho de monografia (BR1020170012646) e outras patentes elaboradas por pesquisadores do departamento (BR1020150129963) não foram recuperadas na busca por proteases vegetais na manufatura de queijo. Isso acontece porque a busca no INPI não permite a recuperação de

processos em análise e também devido ao período de sigilo de 18 meses após o depósito, comum em diversos países (HONG, 2004).

Figura 13 - Distribuição das 18 patentes encontradas no *Espacenet* na busca por **proteases** na produção de queijo.



Fonte: Elaborada pelo autor.

(A) Divisão das patentes recuperadas por jurisdição de proteção, ou seja, local em que a patente se encontra protegida. (B) Divisão das patentes recuperadas por regiões depositantes.

Diante de todos os dados expostos na prospecção tecnológica, torna-se claro o interesse do mercado mundial em tecnologias que englobam peptidases. O pequeno volume de informações em proteases vegetais revela que esse tipo de fonte possui um enorme

potencial a ser explorado, sendo este ponto uma oportunidade de crescimento para o grande mercado de enzimas.

Juntando isso à crescente importância do setor alimentício, verificaram-se poucas inovações com coagulantes para produção de queijo. Portanto, esse ramo também se mostra como um ponto de futuro desenvolvimento tecnológico tanto no Brasil quanto globalmente.

Dessa forma, a patente desenvolvida no Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas com as proteases do extrato do purê de noni confirma-se como uma inovação relevante e possui espaço para ser absorvida pelo mercado mundial de proteases.

3.4 Conclusões

Do ponto de vista da análise do mercado pela prospecção de patentes, verificou-se a significância do mercado de enzimas proteolíticas pelo volume de patentes encontradas e também se revelou que as empresas são os principais interessados nessas inovações. Ademais, o mercado de queijos pareceu limitado em questão de inovação, sendo o produto formulado um forte candidato para atuação no setor. O interesse de investir em tecnologias que abrangem proteases também é estimulado pela ausência de patentes de origem brasileira depositadas no INPI. Logo, o país ainda possui grande potencial de crescimento nesse ramo de desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, I.; SHIMAZU, C. The geographic origin of the plants most commonly used for medicine by Hawaiians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 14, n. 2-3, p. 213-222, 1985.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 16, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 03 dez. 1999. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RESOLUCAO_16_1999.pdf/>. Acesso em: 28 out. 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta Pública nº 86, de 7 de dezembro de 2005. Regulamento Técnico Mercosul sobre “lista geral harmonizada de aditivos alimentares e suas classes funcionais”. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 dez. 2005. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B12925-1-0%5D.PDF>>. Acesso em: 19 set. 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Informe Técnico nº 25 de maio de 2007. Última atualização em junho de 2008. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395734/Informe%2BT%25C3%25A9cnico%2B sobre%2BNoni.pdf/a7cc27da-fe1c-4017-8417-a2c81338efd4>>. Acesso em: 9 ago. 2017.

ALBALASMEH, A. A.; BERHE, A. A.; GHEZZEHEI, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 253-261, 2013.

ALEXANDERSSON, E. et al. Field-omics- understanding large-scale molecular data from field crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 286, 2014.

AMPARO, K. K. S.; RIBEIRO, M. C. O.; GUARIEIRO, L. L. N. Estudo de caso utilizando mapeamento de prospecção tecnológica como principal ferramenta de busca científica. **Perspectivas em Ciência da Informação**, v. 17, n. 4, p. 195-209, 2012.

ARAÚJO, J. B. C *et al.* Produção artesanal de queijo coalho, ricota e bebida láctea em agroindústria familiar. Embrapa, Brasília, ed. 1, 2012.

ASSI, R. A. *et al.* Morinda citrifolia (Noni): A comprehensive review on its industrial uses, pharmacological activities, and clinical trials. **Arabian Journal of Chemistry**, 2015.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 900.02). Arlington: A.O.A.C., 1996 chapter 44. p. 3.

ASTWOOD, J.D.; LEACH, J.N.; FUCHS, R.L. Stability of food allergens to digestion in vitro. **Nature Biotechnology**, v. 14, n. 10, p. 1269-1273, 1996.

- BASICS of cheese making. Real Vegan Cheese. 2017. Disponível em: <https://wiki.realvegancheese.org/index.php/Basics_of_cheese_making>. Acesso em: 11 dez. 2017.
- BBC RESEARCH. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications Report ID: BIO030J. [s.l: s.n.]. 2017.
- BOLZAN, R. Bromatologia. Frederico Westphalen: Rede e-Tec Brasil, 2013. p. 15-26
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilization principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRANCO, A.C.S.C. *et al.* Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos wistar e camundongos swiss do biotério professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 2, p. 209-214, 2011.
- 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**, 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**, v. 103, p. 1121-1129, 2017.
- CARVALHO, M.; VENTURINI, C.; GALAN, V. As grandes oportunidades do mercado de queijos no Brasil. MilkPoint Indústria. 2015. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/industria/radar-tecnico/mercado/as-grandes-oportunidades-do-mercado-de-queijos-no-brasil-93301n.aspx>>. Acesso em: 5 jul. 2017.
- 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**, v. 19, n. 6, p. 645-654, 2006.
- CHAO, Z. *et al.* **Morinda citrifolia enzyme skin whitening sunscreen cream and preparation method thereof**. CN n. CN106214579, 31 ago. 2016, 14 dez. 2016. Disponível em: <<https://www.google.com.br/patents/CN106214579A?cl=en>>. Acesso em: 17 nov. 2017.
- CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443-1454, 2015.
- CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Resolução normativa nº 30, de 2 de fevereiro de 2016. Baixa a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil** de 03 fev. 2016 (nº 23, Seção 1, pág. 3), Brasília, 2016. Disponível em: <https://ww2.icb.usp.br/icb/wp-content/uploads/bioterio_etica/RESOLUCAO_NOR_30.pdf> Acesso em: 02 maio 2017.

CORREIA, A. A da S *et al.* Caracterização química e físico-química de polpa de noni (*Morinda citrifolia* L.) cultivado no estado do Ceará. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, n.04, p. 606-615, 2011.

CRABBE, M. J. C. Rennets: general and molecular aspects. **Cheese: Chemistry, physics and microbiology**, v. 1, p. 19-45, 2004.

DAIHA, K. *et al.* Enzyme technology in Brazil: trade balance and research community. **Brazilian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 1, 2016.

ELKINS, Rita. **Hawaiian Noni (*Morinda citrifolia*): prize herb of Hawaii and the South Pacific**. Houghton Mifflin Harcourt, 1998.

EM DISCUSSÃO! Revista de Audiências Públicas do Senado Federal. Inovação: País constrói pontes entre ciência e indústria. Em discussão! **Revista de Audiências Públicas do Senado Federal**, v. 3, n. 12, p. 1-72, 2012.

ENZYME Nomenclature. Disponível em: <<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em: 18 nov. 2017.

EUROPEAN OFFICE. EPO - Espacenet: patent database with over 100 million documents. Disponível em: <<http://www.epo.org/searching-for-patents/technical/espacenet.html#tab-1>>. Acesso em: 28 out. 2017.

FALLAS-RAMIREZ, J. M.; HERNANDEZ, L.; VAILLANT, F. Untargeted metabolomic profiling of urine in Wistar rats reveals enhanced bioavailability of soy isoflavones post short-term consumption of noni (*Morinda citrifolia*) juice. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 51-59, 2018.

FARIAS, V. A. Peptidases cisteínicas do fruto de noni (*Morinda citrifolia* L.) como agentes coagulantes de leite. 2016. 103 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/23822>>

FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DO CEARÁ. Rotas Estratégicas Setoriais - Núcleo de Economia e Estratégia do Sistema FIEC. 2016. Disponível em: <<http://www1.sfiec.org.br/nucleodeeconomia/programas/92187/rotas-estrategicas-setoriais>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

FERNÁNDEZ-LUCAS, J.; CASTAÑEDA, D.; HORMIGO, D. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 68, p. 91-101, 2017.

FREEDONIA GROUP (2014) World enzymes—demand and sales forecasts, market share, market size, market leaders. Disponível em: <<http://www.freedoniagroup.com/World-Enzymes.html>>. Acesso em: 15 nov. 2017

GLOBAL MARKET INSIGHTS. Enzymes Market, 2016 – 2024, Report ID: GMI743. [s.l.] Global Market Insights, 2017. Acesso em: 17 nov. 2017.

GOLDEN, K. D.; SMITH-MARSHALL, J. Characterization of bromelain from *Morinda citrifolia* (Noni). **Journal of Scientific Research**, v. 4, n. 2, p. 445, 2012.

GUTIERREZ, L. E. *et al.* Carboidratos solúveis em frutos: I. romã, manga, banana, jaboticaba, limão, abacaxi, laranja e cabeludinha. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 33, p. 167-172, 1976.

HADIJAH, H. *et al.* Acute and subchronic toxicity studies of an aqueous extract of *Morinda citrifolia* fruit in rats. **Journal of Tropical Agriculture and Food Science**, v. 31, p. 67-74, 2003.

HADIJAH, H.; NORMAH, A.; TARMIZI, S.A. Thirteen-week toxicity study of mengkudu juice (*Morinda citrifolia*): Effect on the blood analysis. **Journal of Tropical Agriculture and Food Science**, v. 36, n. 2, p.000-000, 2008.

HONG-CAI, Z. *et al.* Two new saccharide fatty acid esters from the fruit of *Morinda citrifolia* L. and their ABTS radical scavenging activities. **Records of Natural Products**, v. 8, n. 1, p. 25, 2014.

HONG, S. The magic of patent information. [s.l.]: WIPO, 2004. Disponível em: <http://www.wipo.int/export/sites/www/sme/en/documents/pdf/patent_information.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2017.

HU, A. G.; JEFFERSON, G. H. A great wall of patents: What is behind China's recent patent explosion? **Journal of Development Economics**, v. 90, n. 1, p. 57-68, 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 21-22.

IPC PUBLICATION. Disponível em: <<http://web2.wipo.int/classifications/ipc/ipcpub?notion=scheme&version=20170101&symbol=none&menulang=en&lang=en&viewmode=f&fipcp=no&showdeleted=yes&indexes=no&headings=yes¬es=yes&direction=o2n&initial=A&cwid=none&tree=no&searchmode=smart>>. Acesso em: 2 nov. 2017.

ISMAIL, N.; RAZAK, N. A. Characterization and purification of protease extracted from two maturity stages of 'Noni' (*Morinda citrifolia* L.) fruit. **Scientific Research Journal**, v. 11, n. 2, p. 1-16, 2014.

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

KAMATA, M. *et al.* Cell-based chemical genetic screen identifies damnacanthal as an inhibitor of HIV-1 Vpr induced cell death. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 348, n. 3, p. 1101-1106, 2006.

KHAIRULLAH, Z., *et al.*, 2014. Evaluation of the acute and subacute dermal toxicity of the ethanolic fruit extract of *Morinda citrifolia* in male and female rats. *Malaysian journal of veterinary research*, v. 5, s. 1, p. 395, 2014.

KOVENDAN, K. *et al.* Evaluation of larvicidal and pupicidal activity of *Morinda citrifolia* L.(Noni)(Family: Rubiaceae) against three mosquito vectors. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. S362-S369, 2012.

KOVENDAN, K. *et al.* Mosquitocidal properties of *Morinda citrifolia* L.(Noni)(Family: Rubiaceae) leaf extract and *Metarhizium anisopliae* against malaria vector, *Anopheles stephensi* Liston.(Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. S173-S180, 2014.

KUPFER, D.; TIGRE, P.B. Modelo SENAI de Prospecção: Documento Metodológico. Capítulo 2: Prospecção Tecnológica. In: Organización Internacional Del Trabajo CINTERFOR. Papeles de La Oficina Técnica n.14, Montevideo: OIT/CINTERFOR, 2004

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LI, X. Behind the recent surge of Chinese patenting: An institutional view. **Research Policy**, v. 41, n. 1, p. 236-249, 2012.

LU, Y. *et al.* Solubilization of rehydrated frozen highly concentrated micellar casein for use in liquid food applications. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p. 5917-5930, 2015.

MANDUKHAIL, S. R.; AZIZ, N.; GILANI, A. H. Studies on antidyslipidemic effects of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit, leaves and root extracts. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, n. 1, p. 88, 2010.

MAYERHOFF, Z. D. V. L. Uma Análise Sobre os Estudos de Prospecção Tecnológica. **Cadernos de Prospecção**, v. 1, n. 1, p. 7-9, 2008.

MCCLATCHEY, W. From Polynesian Healers to Health Food Stores: Changing Perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). **Integrative Cancer Therapies**, v. 1, n. 2, p. 110-120, 2002.

MEMBER states of the European Patent Organisation. Disponível em: <<https://www.epo.org/about-us/foundation/member-states.html>>. Acesso em: 4 nov. 2017.

MINTEL. Cheese in Brazil (2014) – Market Sizes. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://store.mintel.com/cheese-in-brazil-2014-market-sizes>>. Acesso em: 5 jul. 2017.

MOHD ZIN, Z. *et al.* Isolation and identification of antioxidative compound from fruit of mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). **International Journal of Food Properties**, v. 10, n. 2, p. 363-373, 2007.

MOTYAN, J. A.; TOTH, F.; TOZSER, J. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. **Biomolecules**, v. 3, n. 4, p. 923-942, 2013.

MOUDRÁ, K. *et al.* The combined effects of fat content, calcium chloride, and coagulant concentration on the development of cheese curd structure. **International Dairy Journal**, v. 73, p. 92-97, 2017.

MÜLLER, J.C. *et al.* Morinda citrifolia Linn (Noni): in vivo and in vitro reproductive toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, n. 2, p. 229-233, 2009.

NASSU, R. T.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P. Queijo de coalho. 1. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006.

NOVOZYMES, a world leader in bioinnovation, opens new R&D laboratories and Customer Solutions facilities that will expand existing R&D efforts at Novozymes' site in Araucária, a city nearby Curitiba, Paraná, Brazil. 2011. Disponível em: <<https://www.novozymes.com/news/news-archive/2011/11/novozymes-inaugurates-rd-laboratories-in-brazil->>. Acesso em: 16 nov. 2017.

O'CONNOR, C. **Traditional cheesemaking manual**. International Livestock Centre for Africa, Addis Ababa (Etiopia), 1993.

OLIVEIRA, M; QUENTAL, C. A prospecção tecnológica como ferramenta de planejamento estratégico para construção do futuro do Instituto Oswaldo Cruz. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação & Inovação em Saúde**, v. 6, n. 1, p. 50-61, 2012.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline for the testing of chemicals 408 – **Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents**, 1998.

PANDEY, A. *et al.* Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry. 1. ed. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 119-120

PATEL, Anil Kumar; SINGHANIA, Reeta Rani; PANDEY, Ashok. Novel enzymatic processes applied to the food industry. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 64-72, 2016.

PATENT register portal. Disponível em: <<http://www.wipo.int/branddb/portal/portal.jsp>>. Acesso em: 12 set. 2017.

PCT FAQs. Disponível em: <<http://www.wipo.int/pct/en/faqs/faqs.html>>. Acesso em: 4 nov. 2017.

POKORA, M. *et al.* Biological and functional properties of proteolytic enzyme-modified egg protein by-products. **Food Science & Nutrition**, v. 1, n. 2, p. 184–95, 2012.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; FINN, R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D343-D350, 2015.

RAZAFIMANDIMBISON, S. *et al.* Origin of the pantropical and nutraceutical Morinda citrifoliaL. (Rubiaceae): comments on its distribution range and circumscription. **Journal of Biogeography**, v. 37, n. 3, p. 520-529, 2010.

RESENDE, D.O. *et al.* Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/comprovacao-de-seguranca>>. Acesso em: 19 set. 2017.

RICCERI, J.; BARBAGALLO, R. N. Role of protease and oxidase activities involved in some technological aspects of the globe artichoke processing and storage. **LWT-Food Science and Technology**, v. 71, p. 196-201, 2016.

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

SANG, S. *et al.* Chemical components in noni fruits and leaves (*Morinda citrifolia* L.). p. 134-150, 2002.

SATHE, S.K. Solubilization and electrophoretic characterization almond (*Prunus amygdalus* L.) proteins. **Journal of Food Biochemistry**, v. 16, p. 249-264, 1993.

SELLERS, R. *et al.* Society of Toxicologic Pathology Position Paper: Organ Weight Recommendations for Toxicology Studies. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 5, p. 751-755, 2007.

SHAH, Manzoor Ahmad; MIR, Shabir Ahmad; PARAY, Mohd Amir. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. **Dairy Science & Technology**, v. 94, n. 1, p. 5-16, 2014.

SHALAN, N.A.A.M.; MUSTAPHA, N.M.; MOHAMED, S. Chronic toxicity evaluation of *Morinda citrifolia* fruit and leaf in mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 83, p. 46-53, 2017.

SHEORAN, S.; DHANKHAR, R. A Review on technological innovations and cost effectiveness: A green industrial approach for amylase production. **Journal of Environmental Science, Computer Science and Engineering & Technology**. v. 5, n. 1, p. 45-60, 2016.

SOUSA, J. A. *et al.* Produção de mudas de Noni (*Morinda citrifolia* L.). **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2010.

TAHITIAN NONI INT INC. Godbee, R. *et al.* **Morinda citrifolia enhanced products for administration to animal**. WO n. WO2007084983, 20 jan. 2006, 6 dez. 2007. Disponível em:

<<https://www.google.tl/patents/WO2007084983A2?cl=en>>. Acesso em: 17 nov. 2017.

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

WANG, C.Y. *et al.* Probiotic potential of noni juice fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. **International Journal of Food Sciences And Nutrition**, v. 60, n. sup6, p. 98-106, 2009.

WANG, M. *et al.* Novel trisaccharide fatty acid ester identified from the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 4880-4882, 1999.

WEI, Z.Y. *et al.* Production of Bioactive Recombinant Bovine Chymosin in Tobacco Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, p. 624, 2016.

WEISS, D.; WARDROP, K. Schalm's veterinary hematology. 6. ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. p. 78-84.

WEST, B.J.; SU, C.X.; JENSEN, C.J. Prenatal toxicity test of *Morinda citrifolia* (noni) fruit. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 33, n. 5, p. 647-649, 2008.

WEST, B.J.; SU, C.X.; JENSEN, C.J. Hepatotoxicity and subchronic toxicity tests of *Morinda citrifolia* (noni) fruit. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 34, n. 5, p. 581-585, 2009.

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION - Search International and National Patent Collections. Disponível em:
<https://patentscope.wipo.int/search/en/help/data_coverage.jsf;jsessionid=19D8E6891ED44F581C187D863DB64AE7.wapp2nA>. Acesso em: 28 out. 2017.

XAVIER-FILHO, J. *et al.* Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 4, p. 1139-1143, 1989.

YU, H. **Anti-inflammatory constituents in Noni (*Morinda citrifolia*) fruits, sweet orange (*Citrus sinensis*) peel, and biotransformation pathway of nobiletin**. 2004. Tese de Doutorado. Rutgers University.

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