



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

HUGO DE BRITO LEITE

DISSERTAÇÃO

APLICAÇÃO DE PEPTIDASES LATICÍFERAS PARA PRODUÇÃO DE QUEIJO
COALHO VEGETARIANO

FORTALEZA

2016

HUGO DE BRITO LEITE

Aplicação de peptidases laticíferas para produção de queijo coalho vegetariano.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas

FORTALEZA

2016

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)

L552a Leite, Hugo de Brito.
Aplicação de peptidases laticíferas para produção de queijo coalho vegetariano / Hugo de Brito Leite. – 2016.
84 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas.

1. Caseína. 2. Quimosina. 3. Peptidases. 4. Coalho vegetal. 5. Coagulação do leite. I. Título.


CDD 572


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica.


Aplicação de peptidases laticíferas para produção de queijo coalho vegetariano.

Aprovada em: 30/05/2016.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Cleverton Diniz Figueira de Freitas (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Prof. Dr. Davi Felipe Farias
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

A Deus. Aos meus pais, e todos que de alguma forma contribuíram com a realização desse trabalho.

Fontes de financiamento

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará (UFC), através da equipe de Biotecnologia Molecular de Látex Vegetal, representada pelo Laboratório de Biotecnologia de Proteases Vegetais coordenado pelo professor Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas e pelo Laboratório de Plantas Laticíferas chefiado pelo professor Dr. Márcio Viana Ramos.

Universidade de Fortaleza (Unifor), através do Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos. Coordenado pela Professora Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira, do Curso de Farmácia – Centro de Ciências da Saúde (CCS).

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas, pela excelente orientação, por não medir esforços no desenvolvimento deste trabalho, por sua paciência em transmitir seus conhecimentos e por me dar a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Meus sinceros agradecimentos;

Ao prof. Dr. Márcio Viana Ramos por incentivar a tentar a seleção de mestrado na UFC, pelo seu entusiasmo com o projeto e com a pesquisa acadêmica, pelos momentos de incentivo e descontração, por transmitir seu conhecimento e por permitir a utilização do espaço físico e de reagentes do laboratório de plantas laticíferas.

Ao prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira por aceitar o convite para participar da banca examinadora, ser o primeiro incentivador de minha recente carreira científica ao me aceitar como estudante de Iniciação Científica no Laboratório de Proteínas de Defesa de Plantas, aos ensinamentos transmitidos e pela inestimável contribuição neste trabalho.

Ao prof. Dr. Davi Felipe Farias por sua gentileza, disponibilidade para participar da banca examinadora e pelas valiosas sugestões.

Ao prof. Dr. Antônio Egito, pesquisador da Embrapa, pela ajuda com a manufatura dos queijos e valiosos conselhos para a realização deste trabalho.

Aos funcionários e técnicos de laboratório do DBBM, Maria Gildemar, Gilmar Carvalho, Daniel, Eliane Silva e Carlos Eduardo por facilitarem a resolução de problemas burocráticos.

À Carolina Viana por ter me recebido tão bem no laboratório e me ajudar na escrita e revisão deste trabalho.

Aos colegas de trabalho do laboratório de plantas laticíferas Raíssa Lima, Juliany Fátima, Filipe Bessa, Aline, Rafaela Oliveira, Deborah, Camila Tauane, Bia Nishi, Wallace Cruz, Maria Zelandia, Francisco Eilton, Júnior Abílio, Isabel Cristina e Daniel de Brito, pelos ensinamentos, ajuda nas coletas de látex e companhia agradável nesses dois anos de mestrado.

Ao grupo dos queijos representado pelos alunos de Iniciação Científica João Pedro, Jackson Lima, Clara Facó e Andreza pela amizade e inestimável ajuda, principalmente durante a experimentação.

Aos colegas de graduação Emanuel Francelino (Mabel), Victor Segundo, Yasmine Lima (Mone), Roberta Costa, Ítalo Gabriel, Raíssa Novais e Cláudia Lóssio que mesmo cada um tomando rumos acadêmicos diferentes ainda mantivemos boa convivência e amizade sincera.

À minha família pelo apoio incondicional e por não medir esforços para que eu chegasse à conclusão deste trabalho.

Ao amigo Iran pela boa convivência e pelos fins de semana dedicados a me auxiliar na produção dos queijos.

Aos amigos de infância que são considerados parte da família Thiago, Markus Vinícius, Diego Leite, Dieyson Brito e Mateus Fiúza pelo apoio dado ao longo desta caminhada.

Aos colegas da turma de mestrado, Patricio Servente, Rony, João Victor, Gabrielle de Paula e Thais Andrade pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

Em memória de Alcides Santos e Jackson de Carvalho por sua inestimável contribuição em minha vida.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire

RESUMO

Peptidases são enzimas capazes de realizar a clivagem de ligações peptídicas de outras proteínas e peptídeos. Essas enzimas apresentam um amplo espectro de aplicações, pois são utilizadas desde a indústria alimentícia até mesmo no processamento de couro e pele e formulações de medicamentos. Peptidases também têm sido utilizadas na indústria de laticínios para a produção de queijos. A coagulação das caseínas do leite é a principal etapa na produção de queijos do tipo coalho. O coalho ou renina é composto por quimosina e quando adicionado ao leite produz a primeira etapa de formação do queijo, a coagulação. Devido a restrições de consumo de alimentos que utilizem o coalho animal por razões de hábitos alimentares (vegetarianismo) ou por razões religiosas (judaísmo e islamismo) a busca por enzimas coagulantes alternativas à quimosina tem intensificado. O presente trabalho objetivou avaliar as atividades caseinolítica e coagulante do leite de cinco diferentes extratos de proteínas laticíferas para a produção de queijo. As frações laticíferas obtidas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 6,5 e submetidas aos seguintes ensaios: atividade proteolítica total, atividade proteolítica com diferentes ativadores, atividade de coagulação do leite, avaliação da hidrólise da caseína total por SDS-PAGE e avaliação da κ -caseína ao longo do tempo através de SDS-PAGE em géis de poli(acrilamida) 15%, estabelecimento de um protocolo de produção do queijo tipo coalho e detecção de peptidases após a produção do queijo. Somente as frações de *C. procera*, *C. grandiflora* e *C. papaya* exibiram atividade proteolítica e atividade coagulação do leite, estas peptidases foram ativadas por DTT e L-cisteína. O tempo de coagulação do leite pelas peptidases laticíferas foi dose-dependente, sendo 60 μ g a quantidade ideal para coagular 2 mL de leite. *C. procera* e *C. grandiflora* apresentaram atividade específica de coagulação do leite idênticas ao coalho comercial de origem animal. Altas concentrações de NaCl e CaCl₂ não afetaram a atividade proteolítica e de coagulação do leite. Entretanto, a pré-incubação dessas amostras a 75° C por 10 minutos eliminou completamente suas atividades. Ambas as frações proteolítica demonstraram-se capazes de hidrolisar a κ -caseína e produzir peptídeos de 16 kDa de maneira idêntica ao coalho comercial. Os queijos gerados com as peptidases laticíferas apresentaram sabor agradável, textura firme, aroma e rendimento similares aos queijos produzidos com a quimosina comercial. Também não foi detectada atividade proteolítica após a produção do queijo. Dessa forma, as peptidases de *C. procera* e *C. grandiflora* podem ser utilizadas como alternativa a quimosina na produção de queijo coalho.

Palavras-chave: Caseína, Quimosina, Peptidases, Coalho vegetal, Coagulação do leite.

ABSTRACT

Peptidases are enzymes capable of performing cleavage of peptide bonds of other proteins and peptides. These enzymes exhibit a broad spectrum of applications because they are used from the food industry to the leather and skin processing and drug formulation. Peptidases also have been used in the dairy industry for the cheese production. The coagulation of milk caseins is the main step in the production of the cheese curds. Rennet or renin are consist of chymosin and when added to the milk they cause the first step of forming cheese, the coagulation. Due to restrictions of food intake using animal rennet because of eating habits (vegetarianism) or religious reasons (Judaism and Islamism) the search for coagulating enzymes alternatives to rennet has intensified. The present work aimed to evaluate the caseinolytic and coagulant activities of the milk of five different latex protein extracts for the production of cheese. The latex fractions obtained were dissolved in Tris-HCl 50 mM pH 6.5 buffer and submitted to total proteolytic activity assays with different activators, milk coagulation, total casein hydrolysis, and of κ -casein over time by SDS-PAGE on 15% polyacrylamide gels, establishing a protocol for cheese curd production and detecting peptidases after the production of cheese. Only the fractions of *C. procera*, *C. grandiflora*, and *C. papaya* showed proteolytic activity and milk coagulation activity. These peptidases were activated by DTT and L-cysteine. The milk coagulation time by latex peptidases is dose dependent with 60 μ g being the optimum amount to coagulate 2 mL of milk. *C. procera* and *C. grandiflora* showed specific activity of milk coagulation close to the commercial rennet of animal origin. High concentrations of NaCl and CaCl₂ did not affect the proteolytic activity and coagulation of milk. However, the pre-incubation of these samples at 75° C for 10 minutes completely eliminated their activities. Both proteolytic fractions proved to be capable of hydrolyzing κ -casein and producing peptides of 16 KDa similarly the commercial rennet. The cheeses generated by the latex peptidases had nice flavor, firm texture, scent and yield similar to cheeses produced with commercial chymosin. Also, no proteolytic activity was detected after the production of cheese. This way, the peptidases from *C. procera* and *C. grandiflora* can be used as an alternative to chymosin in the production of cheese curds.

Key words: Casein, Chymosin, Peptidases, Vegetable coagulant, milk-clotting.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Enzimas	19
1.1.1	Peptidases	20
1.1.2	Peptidases cisteínicas	21
1.2	Látex	22
1.3	<i>Calotropis procera</i> (Ait.) R. Br.	23
1.4	<i>Cryptostegia grandiflora</i> R. Br.	24
1.5	Estudo de outras plantas laticíferas: Plumeria rubra , Himatanthus drasticus e Carica papaya	25
1.6	Produção de queijos	28
1.6.1	Leite	28
1.6.2	Caseínas	29
1.6.3	Queijo coalho e coagulação do leite	30
1.7	Uso de peptidases vegetais na fabricação de queijos	33
2	JUSTIFICATIVA	35
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivo geral	36
3.2	Objetivos específicos	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	Materiais	37
4.1.1	Reagentes	37
4.2	Material biológico	37
4.3	Métodos	37
4.3.1	Coleta e fracionamento de látex	37
4.3.2.1	Atividade proteolítica total	38
4.3.2.2	Efeito de diferentes ativadores de peptidases cisteínicas	39
4.3.3	Atividade de coagulação do leite	39
4.3.4	Análise da hidrólise das caseínas	40
4.3.4.1	Preparação da caseína bovina completa	40
4.3.4.2	Análise da hidrólise das caseínas por SDS-PAGE	40
4.3.4.3	Determinação do sítio de clivagem na κ -caseína pelas peptidases laticíferas	41

4.3.4.4	Espectrometria de massas	42
4.4	Manufatura do queijo Coalho	42
4.5	Atividade proteolítica dos queijos	45
4.6	Dosagem de proteínas solúveis	45
4.7	Obtenção de anticorpos	45
4.8	Detecção de proteínas laticíferas nos queijos	46
4.9	Análise estatística	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.	47
5.1	Atividade proteolítica dos látices	47
5.2	Atividade de coagulação do leite	52
5.3	Hidrólise das caseínas por peptidases do látex	59
5.4	Espectrometria de massas	64
5.5	Manufatura do queijo e caracterização parcial	68
6	CONCLUSÃO	74
7	REFERÊNCIAS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ação de exo e endopeptidases sob uma cadeia polipeptídica.....	21
Figura 2	Aspectos gerais da planta de <i>C. Procera</i> (Ait.) R. Br.....	24
Figura 3	Aspecto geral da planta <i>C. grandiflora</i> . R. Br.....	25
Figura 4	Aspecto geral da planta <i>P.rubra</i>	26
Figura 5	Representação da planta <i>H. drasticus</i> e suas flores.....	27
Figura 6	Representação da planta <i>C. papaya</i> e seus frutos.....	28
Figura 7	Modelo tridimensional da micela de Caseína (A). Modelo esquemático da micela de caseína – corte transversal (B).....	30
Figura 8	Identificação do ponto de corte da coalhada (A) e do coalho cortado em quadrantes.....	33
Figura 9	Esquema de obtenção da fração proteica do látex (PL).....	38
Figura 10	Insumos e equipamento utilizados para produção de queijo coalho. (A) pó liofilizado de PLCp, (B) pó liofilizado de PLCg, (C) coalhos comerciais e prensa (D).....	42
Figura 11	Fluxograma do processo de produção de queijo coalho.	43
Figura 12	Atividade proteolítica das frações proteicas do látex (PL) de <i>C. procera</i> , <i>C. grandiflora</i> , <i>P. rubra</i> , <i>H. drasticus</i> , <i>C. papaya</i> e das enzimas purificadas bromelaína e papaína, utilizando azocaseína 1% como substrato e DTT 3 mM como ativador.	48
Figura 13	Efeito de diferentes agentes redutores sobre a atividade proteolítica de <i>C. Procera</i> (A), <i>C. grandiflora</i> (B), <i>P. rubra</i> (C) e <i>C. papaya</i> (D).	50
Figura 14	Aspecto geral da atividade de coagulação do leite pelas peptidases laticíferas, das enzimas purificadas bromelaína e papaína e dos coalhos comerciais Halamix® e Coalhopar®.	52

Figura 15	Tempo de coagulação do leite após adição de diferentes quantidades das peptidases laticíferas, enzimas purificadas bromelaína e papaína.	54
Figura 16	Efeito de diferentes concentrações de CaCl ₂ (A) e NaCl (B) no tempo de coagulação do leite pelas peptidases de <i>C. procera</i> , <i>C. grandiflora</i> , <i>C. papaya</i> e as enzimas purificadas Bromelaína e Papaína.	57
Figura 17	Efeito da temperatura na atividade de coagulação do leite pelas peptidases de <i>C. procera</i> , <i>C. grandiflora</i> , <i>C. papaya</i> e as enzimas purificadas bromelaína e papaína.	58
Figura 18	SDS-PAGE (12.5%) da hidrólise das caseínas bovinas pelas peptidases dos látices e de coalhos comerciais em função do tempo. Em detalhe as subunidades α , β e κ da caseína.	59
Figura 19	SDS-PAGE 12,5% da hidrólise das caseínas do leite bovino por <i>C. procera</i> (A) e <i>C. grandiflora</i> (B) em diferentes intervalos de tempo. Em detalhe, a redução gradual das bandas de κ -caseína na região de 30 KDa e o aumento de para- κ -caseína, na região de 16 KDa.	61
Figura 20	SDS PAGE dos coalhos comerciais utilizados nos ensaios.	62
Figura 21	Degradação das caseínas pelas peptidases laticíferas. Valores correspondentes a densitometria das diferentes bandas da SDS-PAGE da Figura 18.	63
Figura 22	Espectro de massas da banda de 16 kDa gerada a partir da hidrólise da κ -caseína com o coalho comercial Coalhopar [®]	65
Figura 23	Sequência de aminoácidos da molécula de κ -caseína (<i>Bos Taurus</i>).	65
Figura 24	Espectro de massas nativo deconvoluído da fração κ -caseína digerida com PLCp após 1 hora de reação, obtido por ESI-TOF.	66
Figura 25	Espectro de massas nativo deconvoluído da fração κ -caseína digerida com PLCg após 1 hora de reação, obtido por ESI-TOF.	67
Figura 26	Imagem dos queijos produzidos por PLCp e PLCg.	69
Figura 27	Atividade proteolítica dos queijos produzidos com as peptidases de <i>C. procera</i> e <i>C. grandiflora</i> , comparada com o controle.	72
Figura 28	Zimograma em gel de poliacrilamida contendo 0,1% de gelatina dos extratos dos queijos produzidos com as peptidases de <i>C. procera</i> e <i>C. grandiflora</i> . Amostras foram extraídas a partir dos queijos liofilizados.	72
Figura 29	Imunodeteccção (ELISA) de proteínas do látex de <i>C. procera</i> (PLCp) e	

C. grandiflora (PLCg) nos queijos produzidos por peptidases destas plantas, utilizando anticorpos policlonais anti-PLCp (A) e anti-PLCg (B). 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Atividades de coagulação do leite e proteolítica das frações laticíferas e dos coagulantes comerciais.	55
Tabela 2	Características dos queijos manufaturados com as peptidases de <i>Calotropis procera</i> e <i>Cryptostegia grandiflora</i> em comparação a quimosina comercial (Coalhopar®).	70

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de Variância
BSA	Albumina Sérica Bovina
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
KDa	QuiloDalton
MAPA	Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento
MS	<i>Mass spectrometry</i>
PLCp	Proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i>
PLCg	Proteínas do látex de <i>Cryptostegia grandiflora</i>
PLPr	Proteínas do látex de <i>Plumeria rubra</i>
PLCap	Proteínas do látex de <i>Carica papaya</i>
PLHd	Proteínas do látex de <i>Himathantus drasticus</i>
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TEMED	N,N,N',N' – tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris-hidroxi-amino-metano
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Ultravioleta
©	Direitos reservados
®	Marca Registrada

1 INTRODUÇÃO

O surgimento dos laticínios foi um passo importante para as sociedades mais primitivas, pois permitia a obtenção de alimentos sem a necessidade de abater animais. Historicamente, o surgimento de queijos se iniciou durante a domesticação de plantas e animais de pastoreio no Oriente Médio e na Ásia Central a cerca de 8000 anos a.C. Esses povos necessitavam conservar o leite que colhiam, então o armazenavam em órgãos internos desidratados, como em bolsas feitas a partir do estômago de caprinos, dessa forma o leite entrava em contato com as enzimas digestivas, incluindo a quimosina, formando a coalhada (SALQUE *et al.*, 2013). O historiador Plínio (23-79 d.C.) narrou que soldados romanos mexiam o leite com ramos contendo folhas de figueira para solidificar o leite, atualmente sabe-se que a ficina, uma peptidase extraída das folhas da figueira, é responsável por essa transformação (AMARANTE, 2015). Ainda há relatos sobre a utilização de queijos na dieta por diversas civilizações, incluindo egípcios e gregos. Com as grandes navegações e a influência do Europeu na América, o queijo foi ainda mais difundido e, atualmente, é produzido em vários tipos (DE PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009; SALQUE *et al.*, 2013).

1.1 Enzimas

Enzimas são excelentes catalisadores que possuem, geralmente, ação em condições brandas de temperatura (30-60 °C), especificidade a substrato, reduzida formação de subprodutos, custo intermediário e podem ser recicladas ao final do processo. Estão entre as moléculas mais estudadas em biotecnologia, devido possuírem diversas aplicações nas indústrias química, farmacêutica, têxtil, agroindustrial, cosmética e alimentícia (TAVANO, 2013). Algumas das restrições quanto à utilização de enzimas em bioprocessos ocorrem pelo fato de apresentarem, ocasionalmente, desenvolvimento de características sensoriais indesejáveis, devido à ação hidrolítica. O controle das condições reacionais (pH, temperatura, tempo de hidrólise, concentração de substrato) é um importante passo para a obtenção de um produto com qualidade sensorial adequada ao consumidor final (CHOI; HAN; KIM, 2015; JEEWANTHI; LEE; PAIK, 2015).

Em 2012, o valor de mercado estimado para essas biomoléculas era de aproximadamente, US\$ 1,3 bilhões. A estimativa projetada é que este mercado cresça a uma taxa anual de 8% e que no ano de 2016 movimente em torno de US\$ 2,5 bilhões de dólares

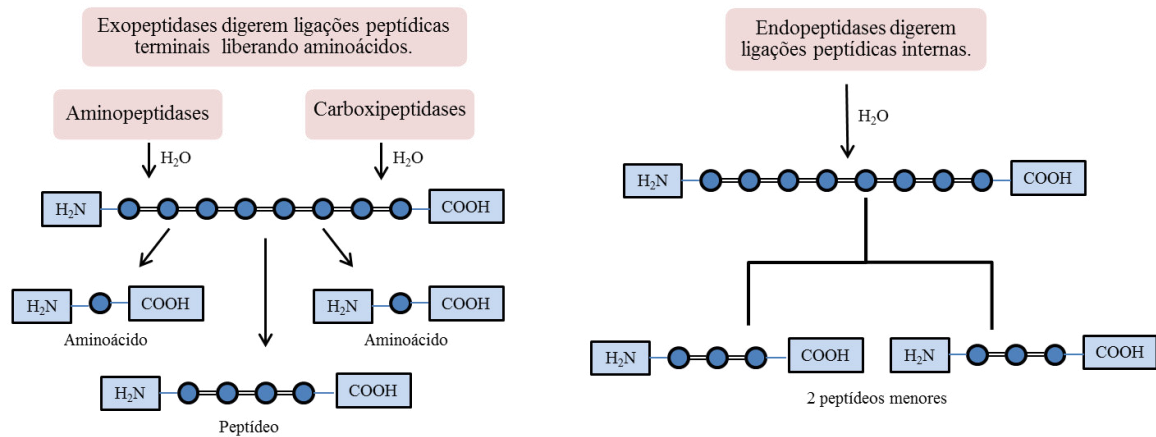
(LEE *et al.*, 2012, VERMELHO *et al.*, 2015). Amilases (α -amilases e glicoamilases), peptidases (quimosina, papaína, bromelaína e pepsina), lipases e pectinases são exemplos utilizados em grande escala. Dentre todas as enzimas com utilização industrial, as peptidases representam cerca de 60% de todo o mercado. (GONZÁLEZ-RÁBADE *et al.*, 2011; VERMELHO *et al.*, 2015).

1.1.1 Peptidases

Também chamadas de proteases ou enzimas proteolíticas, as peptidases têm importante papel nos processos biológicos de todos os seres vivos, estando envolvidas na síntese de proteínas, digestão, sinalização e crescimento celular em animais, e no desenvolvimento e amadurecimento de frutos, degradação proteica, reconhecimento de patógenos e apoptose em plantas (ANRI; MAMBOYA, 2012; COSTA; LIMA, 2016). Essas enzimas podem ser agrupadas de acordo com seu mecanismo químico catalítico. Os aminoácidos presentes no sítio ativo definem seus tipos: do tipo aspártica possuem aspartato e tirosina; do tipo serínica, serina e histidina; do tipo cisteínica, cisteína e histidina; do tipo treonina, possuem treonina; glutamato possuem o ácido glutâmico; e as metalo peptidases possuem íon metálicos no sítio ativo (Zn^{2+} , Ca^{2+} ou Mn^{2+}) (TURK, B.; TURK D.; TURK, V.; 2012). Peptidases do tipo aspártica, serínica e cisteínicas, são mais relatadas quanto suas capacidades de coagular o leite (ORDIALES *et al.*, 2012; FACCIA *et al.*, 2012; SHARMA *et al.*, 2012).

Peptidases são capazes de hidrolisar ligações peptídicas pelo ataque nucleofílico e hidrólise subsequente de um intermediário tetraédrico. São consideradas pelo Comitê Internacional de Nomenclatura Enzimática da União de Bioquímica e Biologia Molecular (NCI-UBMB) como pertencentes à classe 3 (hidrolases) e da subclasse 4 (hidrolisam ligações peptídicas). A subclasse 3.4, por sua vez, pode ser dividida quanto à posição da ligação peptídica a ser clivada: endopeptidases clivam resíduos de aminoácidos localizados na região interna da proteína; enquanto que, aminopeptidases atuam próximas à extremidade N-terminal e carboxipeptidases na região próxima à extremidade C-terminal, as duas últimas podem ser chamadas genericamente de exopeptidases (Figura 1) (CORNISH-BOWDEN, 2014; SIKLOS; BENAÏSSA; THATCHER, 2015).

Figura 1 – Ação hidrolítica de exo e endopeptidases sobre uma cadeia polipeptídica



Fonte: MÓTYÁN; TÓTH; TÓZSÉR (2013), com modificações.

Peptidases são comumente sintetizadas na forma de precursores proteicos inativos chamados de zimogênios. Após a compartimentalização, a conversão desses precursores em enzima ativa ocorre por proteólise e remoção do segmento de ativação, assim prevenindo que a célula que a produziu não seja danificada pela enzima (KHAN; JAMES, 1998).

Na indústria alimentícia, o uso de peptidases pode conferir novas propriedades químicas, físicas e biológicas ao hidrolisado, o qual pode melhorar ou exibir novas características nutricionais, remover proteínas tóxicas, diminuir a alergenicidade e modificar a textura, o sabor e o odor (TAVANO, 2013).

1.1.2 Peptidases cisteínicas

A L-Cisteína é um dos aminoácidos menos abundantes incorporados em proteínas (aproximadamente 1,9% de ocorrência), e encontra-se em regiões estruturalmente importantes, formando pontes dissulfeto e contribuindo para o dobramento da cadeia. O grupamento tiol de sua cadeia lateral (S-H) promove importantes propriedades físico-químicas a proteínas de diversas classes, como catálise redox, catálise nucleofílica, regulação alostérica, ligação a metais e estabilização estrutural. O resíduo de cisteína (Cys), presente no sítio ativo e ativado por histidina (Hys), é utilizado como nucleófilo por peptidases cisteínicas durante a proteólise. E-64 é capaz de inibir irreversivelmente esse tipo de peptidase (VAN DER HOORN, 2008; PACE; WEERAPANA, 2013).

O genoma de plantas pode codificar até 140 peptidases desse tipo, que são capazes de regular o tempo de floração, o desenvolvimento embrionário e de frutos, proteção contra invasores, além de participarem da ativação de zimogênios e hidrolisarem proteínas inativas (KULKARNI; RAO, 2009).

Peptidases cisteínicas de origem vegetal como as de *Carica papaya* (papaína, quimopapaína, caricaína); *Ananas comosus* (bromelaína, ananaína, comosaína) e de *Ficus glabrata* (ficina) têm reconhecida importância comercial por possuírem forte atividade proteolítica sobre diversos substratos proteicos, além de serem estáveis em ampla faixa de pH e temperatura (ARAYA-GARAY *et al.*, 2011).

1.2 Látex

Látex é uma emulsão viscosa, de aspecto leitoso, exsudada de coníferas (*Gnetum* spp.), fungos (*Lactarius* spp.) e algumas famílias de plantas da classe Angiospermae, como *Euphorbiaceae*, por exemplo. Essa substância é liberada após algum órgão vegetal sofrer lesão, seja por herbivoria ou por injúria mecânica. Devido sua capacidade coagulante quando exposto ao ar, o látex é capaz de selar a área afetada, protegendo-a contra o ataque de patógenos. Possuem, em sua composição, água, proteínas, metabólitos secundários, carboidratos, lipídios, vitaminas, além de componentes celulares (AGRAWAL; KONNO, 2009).

O látex apresenta elevada concentração de poli-isopreno (borracha), sendo encontrado em diferentes concentrações nas seguintes espécies: *H. brasiliensis* (*Euphorbiaceae*) 44,3%, *Ficus* spp. (*Moraceae*) 15-30%, *Parthenium argentatum* (*Asteraceae*) 8%, *Calotropis procera* (*Apocynaceae*) 82,52%, *Cryptostegia grandiflora* (*Apocynaceae*) 96,6% e *Plumeria rubra* (*Apocynaceae*) 82,2% (AGRAWAL; KONNO, 2009; KONNO, 2011; FREITAS *et al.*, 2007, 2011).

Os laticíferos são sistemas de canais que são formados por um conjunto de células tubulares alongadas altamente especializadas. É neste local que o látex é produzido e armazenado, podendo estar presente em todas as partes da planta ou isolado em tecidos e órgãos como em raízes, caules, pecíolos e folhas. Dessa forma, o fluido pode ser extraído a partir de seus frutos (*Carica papaya*), folhas (*Calotropis procera*), galhos (*Plumeria rubra*, *Cryptostegia grandiflora*) ou troncos (*Himathantus drasticus*) (PICKARD, 2007; KITAJIMA *et al.*, 2013).

Os látices demonstram ser compostos por uma variedade de tipos de enzimas

proteolíticas, como nas famílias de *Caricaceae*, *Moraceae* e *Apocynaceae*, nas quais já foi relatada a presença de peptidases cisteínicas (SGARBIERI *et al.* 1964; ARRIBÉRE *et al.* 1998), enquanto nas famílias de *Moraceae*, *Euphorbiaceae*, *Apocynaceae* e *Convolvulaceae*, já houve relatos da presença de peptidases do tipo serina (ARIMA *et al.* 2000, TOMAR *et al.* 2008).

As aplicações biotecnológicas de peptidases oriundas de látex ou de seu extrato proteico são inúmeras, como na medicina onde podem atuar na coagulação do plasma sanguíneo (VIANA *et al.*, 2013), também podem possuir atividade anti-inflamatória, anti-helmíntica e anticâncer (SALAS *et al.*, 2008), na agricultura, possivelmente, estão envolvidas na defesa contra insetos e fungos (KONNO *et al.*, 2004; RAMOS *et al.*, 2014), na indústria de alimentos podem desempenhar papel no processo de amaciamento de carnes (RAWDKUEN; JAIMAKREU; BENJAKUL, 2013) e na coagulação do leite (RASKOVIC; LAZIC; POLOVIC, 2016).

1.3 *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.

Pertencente à família *Apocynaceae*, que compreende 280 gêneros e mais de 2000 espécies, *C. procera* é uma planta que possui ampla distribuição geográfica, originária do sudoeste da Ásia e África Tropical. É uma planta perene, pouco ramificada e de porte arbustivo, podendo alcançar de 3 a 4 metros de altura, sendo amplamente difundida em regiões tropicais da América do Sul (Figura 2). Também, é conhecida popularmente como algodão-de-seda, hortêncica, ciúme ou leiteiro, esta última denominação remetendo a sua capacidade de produzir e liberar látex, principalmente das partes verdes da planta (KISSMANN; GROTH, 1999).

No Brasil, foi introduzida como planta ornamental, em Recife no século XIX. Após sua introdução no país, passou a se comportar como invasora de áreas de pastagem. Esta planta tem preferência por solos arenosos e degradados, sendo altamente resistente à seca e facilmente encontrada em beiras de estrada, terrenos abandonados e dunas (LORENZI; MATOS, 2002).

O fluido laticífero de *C. procera* é uma fonte rica de enzimas proteolíticas e muitas destas enzimas têm sido estudadas em termos moleculares, enzimáticos, funcionais e em prospecção biotecnológica (RAMOS *et al.*, 2013). No látex da planta *Calotropis procera* foram recentemente anotados, a partir de uma biblioteca de cDNA, 27 peptidases, todas do tipo cisteínicas (KWON, 2015).

Figura 2 – Aspectos gerais da planta de *C. procera* (Ait.) R. Br.



Fonte: www.plantaslaticiferas.ufc.br

1.4 *Cryptostegia grandiflora* R. Br.

Cryptostegia grandiflora é uma espécie pertencente à família das Apocynaceae, da subfamília Asclepiadoideae. Nativa do continente africano, se adapta bem ao clima tropical e semiárido, inclusive em condições de seca, tais como abastecimento de água limitado e altas temperaturas, mas demonstra robustez ocorrendo também em habitats costeiros com precipitações entre 400 e 1400 mm por ano. É uma planta perene, arbustiva, semi-herbácea, com folhas simples e opostas, com nervura central bem marcada. As inflorescências são formadas principalmente no verão e na primavera, são terminais com flores roxas (Figura 3) (LORENZI; SOUZA, 1999). Como outras espécies da família Apocynaceae, *C. grandiflora* também é capaz de produzir látex (HEAD; ATCHISON; PHILLIPS, 2015).

Vulgarmente chamada de videira da borracha, alamanda roxa ou criptostégia, essa planta apresenta poucos relatos científicos sobre propriedades fisiológicas, farmacológicas ou bioquímicas. Segundo Tiwari e colaboradores (1982), o látex de *C. grandiflora* possui atividade abortífera. Este fluido também demonstrou atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* (CAVALHEIRO, 2010), indutora de inflamação em animais de laboratório (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009) e antifúngica (RAMOS *et al.*, 2014).

Figura 3 – Aspecto geral da planta *C. grandiflora*. R. Br.



Fonte: <http://davesgarden.com>

1.5 Estudo de outras plantas laticíferas: *Plumeria rubra*, *Himatanthus drasticus* e *Carica papaya*.

Plumeria rubra pertence à família Apocynaceae, com altura podendo atingir até 8 metros, geralmente apresenta muitos ramos, lisos, espessos e com bastante seiva leitosa. É uma árvore perene, com folhas arranjas em formato de espiral e de formato ovado-oblongo medindo de 10 a 25 cm de largura e de 10 a 30 cm de extensão. A floração ocorre entre o inverno e a primavera, as flores são brancas com o centro amarelado (Figura 4). Ocorre em áreas de clima quente e úmido e é nativa da América Central. É chamada vulgarmente de Jasmin-Manga ou Flor-de-Santo-Antônio (SHINDE; PATIL; BAIRAGI, 2014; Kumar *et al.*, 2015).

Karnodo e colaboradores (1990) estudaram o efeito algicida, citotóxico e antifúngico de seus metabólitos secundários. A caracterização de enzimas envolvidas com o metabolismo oxidativo e quanto à atividade proteolítica também foi realizada (FREITAS *et al.*, 2010). Seu látex apresenta efeito repelente sobre insetos (RAMOS *et al.*, 2011). Na medicina popular, a decocção¹ da casca e raízes de *P. rubra* é tradicionalmente utilizada para tratar a asma, constipação e reduzir a febre. Seu látex é utilizado para diminuir irritação na pele e o óleo essencial extraídos das flores é utilizado no tratamento de hepatite, diarreia e febre (ZHANG; DONG; CHENG, 2016).

¹ Decocção: As partes da planta são fervidas junto com a água por alguns minutos.

Figura 4 – Aspecto geral da planta *P. Rubra*



Fonte: Próprio autor

Janaguba, nome popular da espécie arbórea *Himatanthus drasticus*, pode crescer até 7 metros de altura, possui folhagem densa nas extremidades dos ramos e está distribuída pelas regiões sudeste, nordeste e norte brasileiro (Figura 5). No Ceará, ocorre com mais frequência na Chapada do Araripe, onde populares extraem seu látex a partir do tronco da planta e comercializam nos mercados públicos como “garrafadas” ou com o nome de “Leite de Janaguba”, sendo consumida por via oral (AMARO *et al.*, 2006). Na medicina popular, a janaguba é utilizada para tratar doenças hepáticas, gastrite, anemia, hemorroida e até contra o câncer (COLARES *et al.*, 2008). Estudos preliminares demonstraram que *H. drasticus* possui ação analgésica, antitumoral e imunoestimulante (COLARES *et al.*, 2008; SOUSA *et al.*, 2010; MOUSINHO *et al.*, 2011).

Figura 5 – Representação da planta *H. drasticus* e suas flores

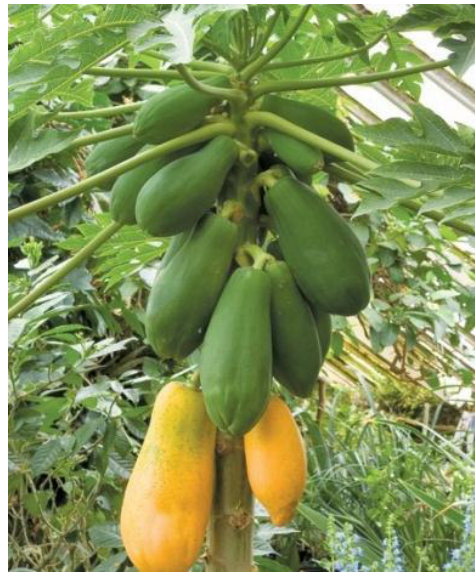


Fonte: Costa, 2012 <http://belezadacaatinga.blogspot.com.br/2012/11/janaguba-himatanthus-drasticus-mart.html>

O mamoeiro, *Carica papaya*, é uma planta herbácea, membro da família Caricaceae (Figura 6), nativa da América Central e cultivada na maioria dos países tropicais. É uma cultura importante do ponto de vista econômico e nutricional. O interesse comercial nesta espécie reside em dois produtos principais: o látex e os frutos (DREW, 2003).

A partir do látex dessa espécie é obtida a papaína (EC 3.4.22.2), uma peptidase cisteínica. É utilizada industrialmente na produção de cosméticos, têxteis, amaciante de carnes e fármacos (XUE *et al.*, 2010) e na área da saúde, sendo utilizada para tratar acne e gastrite, na preparação da vacina contra tétano e coagulante sanguíneo (CHOUDHURY *et al.*, 2009) também é utilizada como coagulante para produção de queijos (DIOUF *et al.*, 2012).

Figura 6 – Representação da planta *C. papaya* e seus frutos



Fonte: <http://logees.com>

1.6 Produção de queijos

1.6.1 Leite

Segundo a Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), Leite é o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições higiênicas, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. Deve ser homogêneo e exibir coloração branca opalescente (BRASIL, 2011). A produção e a qualidade do leite são determinadas por parâmetros de manejo adequado, composição físico-química e higiene (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

A pecuária leiteira é uma atividade comercial importante para o setor agropecuário brasileiro, pois além de integrar a renda de produtores, absorve mão-de-obra rural (contratada ou familiar), de modo a contribuir para a fixação do homem no campo (COUTINHO *et al.*, 2013). Economicamente, o setor leiteiro e de derivados foi responsável por movimentar no ano de 2014, aproximadamente R\$ 34 bilhões de reais, comercializando mais de 35 bilhões de litros de leite, de acordo com o último censo agropecuário realizado pelo IBGE (2014).

Este alimento é considerado indispensável desde o nascimento, pois é capaz de suprir todas as necessidades nutricionais de recém-nascidos. O leite contém aproximadamente 87,3% de água, 4,2% de gordura, 4,6% de lactose, 3,25% de proteína, e 0,65% de substâncias minerais (ZANELLA *et al.*, 2015). Componentes como albumina, citrato, fosfatos e caseínas,

naturalmente presentes, conferem pH levemente ácido (6,6), além da presença de CO₂ dissolvido, que confere efeito tamponante a bebida (SANTOS, 2004; DIAS; ANTES, 2014).

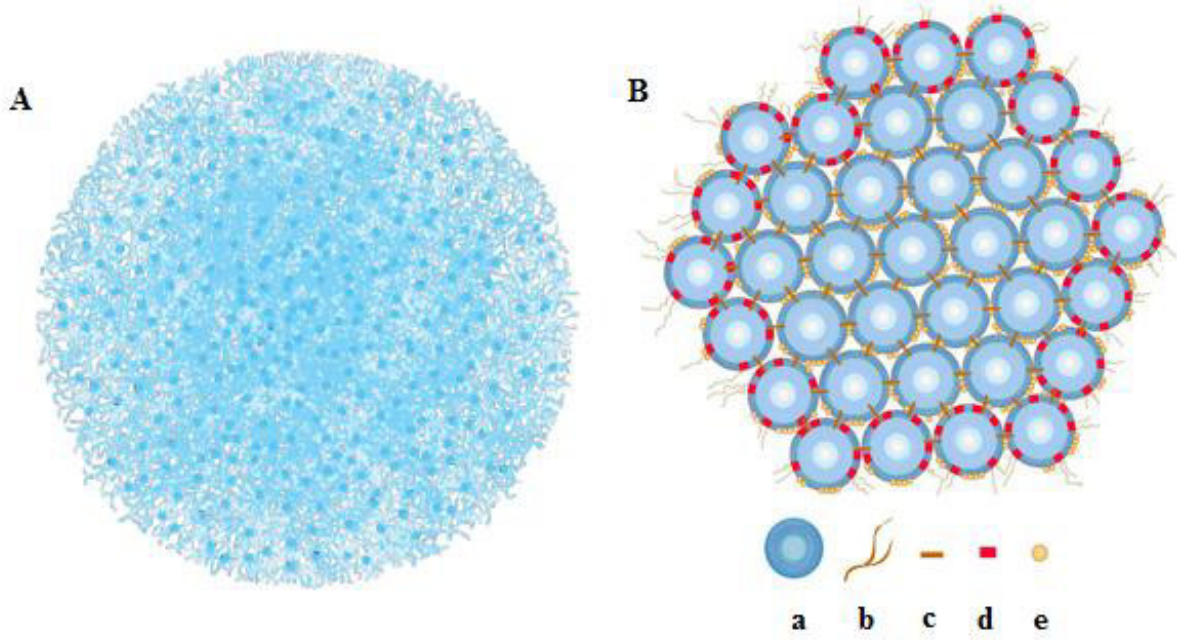
1.6.2 Caseínas

As caseínas são uma família de fosfoproteínas sintetizadas pela glândula mamária e secretadas como grandes agregados coloidais, que são responsáveis por muitas das propriedades físicas características do leite. Correspondem a 80% das proteínas do leite, os outros 20% representam as proteínas do soro. Morfologicamente, as micelas de caseína apresentam um diâmetro que varia de 30 a 300 nm e massa molecular aproximada de $2,5 \times 10^8$ Daltons. A principal função das caseínas como nutrientes é carrear aminoácidos e minerais no leite, dessa forma proporciona sítios de fosforilação e subsequente ligação de minerais tais como o cálcio (GINGER; GRIGOR, 1999; SGARBIERI, 2005).

Normalmente, quatro produtos gênicos são encontrados: α_{S1} -, α_{S2} -, β e κ -caseína que juntas formam a micela de caseína no leite (Figura 7). A família α_{S1} representa até 35% de todas as frações de caseína presentes no leite bovino, enquanto a fração α_{S2} , corresponde a 10% e a β consiste em 40%. Essas subunidades têm por característica serem sensíveis ao cálcio, precipitando na presença deste íon (4 a 6 mM). Em conjunto com a porção κ (15% de ocorrência), que é insensível a íons Ca²⁺, essas frações atuam impedindo ou inibindo a precipitação do grupo sensível na presença de cálcio e formam a micela fosfocaseinato de cálcio (KAWASAKI; LAFONT; SIRE, 2011; HOLT *et al.*, 2013).

A precipitação da caseína total no leite desengordurado pode ocorrer por acidificação, em pH 4,6 e à temperatura de 20 °C, ou por ação de enzimas proteolíticas. A subunidade κ -caseína é susceptível a clivagem pela peptidase aspártica, quimosina (E.C 3.4.23.4). O trabalho de Jolle e colaboradores (1963) demonstrou que a clivagem ocorre entre os resíduos de Phe₁₀₅ e Met₁₀₆ da κ -caseína bovina. Os fragmentos gerados a partir da clivagem são o fragmento C-terminal carregado, glicomacropéptido (do resíduo 106 ao 169), e o péptido hidrofóbico N-terminal, para- κ -caseína (do resíduo 1 ao 105) (PEREIRA *et al.*, 2010; KETHIREDDIPALLI; HILL, 2015).

Figura 7 – (A) Modelo tridimensional da micela de Caseína. (B) Modelo esquemático da micela de caseína – corte transversal.



Legenda:(a) submicela, (b) resíduos hidrofílicos, (c) fosfato de cálcio, (d) κ -caseína, (e) grupos fosfato.

Fonte: <http://www.food-info.net/images/caseinmicelle.jpg>

1.6.3 Queijo coalho e coagulação do leite

O queijo de coalho é definido como o produto obtido por ação de enzimas coagulantes do leite, podendo ser prensado manualmente ou em pequenas prensas e salgado a seco. Contém teor de gordura variando entre 35 e 60%, alto teor de umidade e pode ter a massa cozida ou semicozida. Rico nutricionalmente, possui proteínas, vitaminas e sais minerais, sendo considerado um produto fonte de cálcio e fósforo. Um dos objetivos da produção desse derivado é a conversão do leite, que tem vida útil menor, em um produto menos perecível, além de preservar seus nutrientes (BRASIL, 2001; MAHAJAN; CHAUDHARI, 2014).

Segundo dados do Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA), a população brasileira consome, em média, 4 quilos de queijo *per capita* por ano. Em uma década, a produção aumentou cerca de 86% no Brasil, algo em torno de 745 mil toneladas foram produzidas em 2010, desse total a maior parte se destinou ao consumo interno (BRASIL, 2015).

Tipicamente nordestino, o queijo de coalho é um produto amplamente consumido pela população, podendo ser degustado *in natura* ou assado. Os estados do Ceará, Rio Grande do

Norte, Paraíba e Pernambuco são responsáveis pela maior parte da produção e consumo na região nordeste (ALMEIDA; JÚNIOR; GUERRA, 2013).

A principal etapa para a produção de queijos é a coagulação do leite, para isso são utilizados preparados proteolíticos também chamados de coalho. O Coalho é um composto comercialmente preparado a partir de duas enzimas coagulantes, a quimosina (E.C 3.4.23.4), que corresponde a aproximadamente 90%, sendo os 10% restantes correspondentes à pepsina (E.C 3.4.23.1) (SOUSA; ARDO; MCSWEENEY, 2001). A extração dessas peptidases é feita principalmente do estômago de animais ruminantes, porém o suprimento dessa enzima vem sendo reduzido devido ao aumento da produção industrial de queijos que é limitado pela insuficiente disponibilidade de órgãos destes animais. Adicionalmente, outros fatores como alto preço do coalho, dogmas religiosos (Islamismo e Judaísmo), restrição de hábitos alimentares (vegetarianismo) e proibição de produtos transgênicos em alguns países (Holanda, França) tem motivado a busca por outras fontes de coagulação do leite (EGITO *et al.*, 2007; SHAH *et al.*, 2014).

A coagulação se inicia pela adição da enzima coagulante ao leite, a partir da hidrólise da subunidade κ da caseína, o que gera dois peptídeos, o glicomacropéptido, que tem natureza hidrofílica, permanecendo no soro após a hidrólise e a para- κ -caseína, hidrofóbica, permanece junto às micelas de caseína (KETHIREDDIPALLI; HILL, 2015). Após a hidrólise a carga superficial da molécula é reduzida, o que leva a uma maior aproximação entre as micelas facilitando a agregação, devido a diminuição da repulsão. A presença de íons Ca^{2+} leva a uma maior redução da repulsão entre as micelas de caseína, dessa forma, um gel tridimensional é formado (PEREIRA *et al.*, 2010; FRACASSO; PFÜLLER, 2014).

Algumas plantas produzem peptidases com atividade específica sobre a κ -caseína do leite. No entanto, coagulantes vegetais não são produzidos em larga escala, são utilizados somente em pequenas fábricas (principalmente em Portugal) para produção de queijos artesanais (GARCÍA *et al.*, 2015).

A atividade proteolítica excessiva e a baixa atividade caseinolítica são indesejáveis para um substituinte da quimosina, pois coagulantes com alto nível de proteólise podem gerar uma coalhada estruturalmente deficiente, acarretar em perdas de proteínas e gordura no soro, reduzir o rendimento e conferir sabor amargo ao produto final (JACOB; JAROS; ROHM, 2011).

Outros fatores, como concentração de coalho, pH e temperatura de coagulação influenciam o processo de produção de queijos. Uma grande quantidade de coalho pode alterar a firmeza da coalhada, pois leva a uma hidrólise extensiva de κ -caseína. Em condições

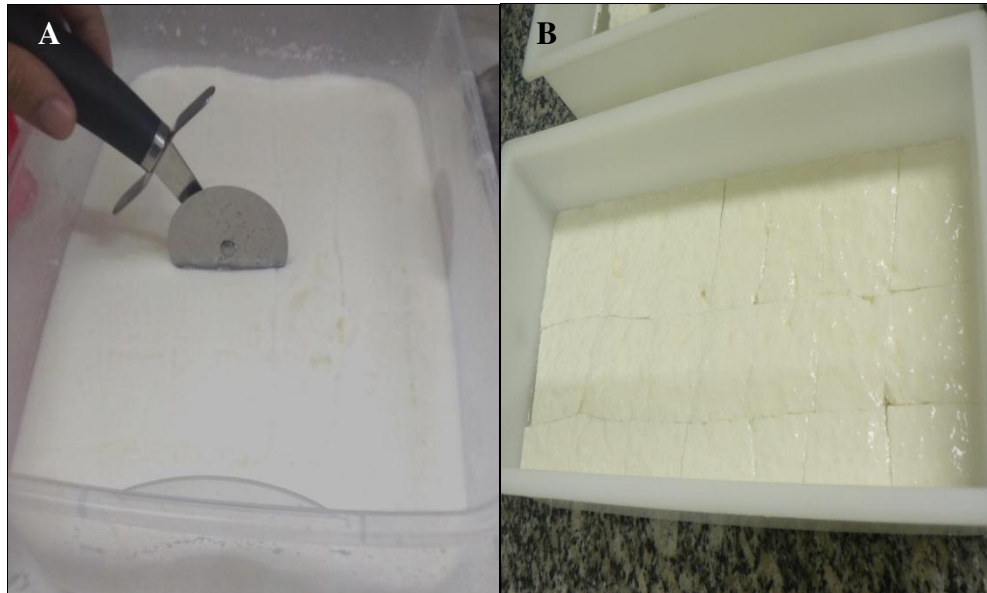
alcalinas o coalho tem atividade coagulante reduzida e não há formação da coalhada, em contraste, em pHs ácidos, a estabilidade das moléculas de caseína é reduzida pelas cargas elétricas do meio. O pH ótimo de ação da quimosina é próximo a 5,5. A temperatura ótima para sua ação é entre 35 e 40 °C. O tratamento térmico pode não eliminar a atividade de um coagulante muito estável termicamente, podendo causar degradação das proteínas durante a etapa de dessoragem (DE PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009; KETHIREDDIPALLI; HILL, 2015).

O processo de elaboração de queijo coalho é simples e de domínio público, no entanto, alguns princípios básicos devem ser observados para obtenção de um produto de qualidade. A adição de ingredientes, a observação do ponto de corte da coalhada, a dessoragem e a salga são processos importantes durante a fabricação (ARAÚJO *et al.*, 2011; MARQUARDT *et al.*, 2013).

Os ingredientes devem ser adicionados após o aquecimento do leite a 37 °C. Primeiramente, cloreto de cálcio é adicionado com a finalidade de melhorar a coagulação do leite, pois é comum sais de cálcio se tornarem insolúveis durante a pasteurização do leite. O leite natural possui cálcio suficiente para uma boa coagulação, razão pela qual se adiciona o cloreto somente ao leite pasteurizado. Assim, o CaCl_2 promove a redução da quantidade de coalho aplicado para coagular uma mesma quantidade de leite, melhora a expulsão do soro, diminui o tempo de coagulação e, por consequência, diminui a variação da atividade coagulante do coalho (GONÇALVES *et al.*, 2010). O coalho é o composto enzimático responsável pela coagulação em um curto espaço de tempo (de 20 a 50 minutos). Pode ser adicionado em pó ou dissolvido em água na quantidade especificada pelo fabricante (LAGUNA; EGITO, 2010).

O ponto de corte da coalhada é variável, podendo ser atingido por volta de 40 minutos após a adição do coalho. Esse ponto é observado quando ao perfurar a coalhada, com auxílio de uma faca, resíduos de leite não são vistos (Figura 8).

Figura 8 – Identificação do ponto de corte da coalhada (A) e do coalho cortado em quadrantes (B).



Fonte: Próprio autor

O soro é um subproduto líquido que resulta da produção de queijo e apresenta, basicamente, uma composição de 93% de água, 4,9% de lactose, 0,8% de proteína, 0,5% de minerais e 0,2% de gordura (ORDÓÑEZ, 2005). Na etapa de dessoramento ou sinérese, cerca de 90% do soro é expulso da coalhada, influenciando a umidade, acidificação e proteólise do produto final (MARQUARDT *et al*, 2013).

A salga pode ser realizada de duas maneiras distintas: o sal pode ser diluído no soro ou diretamente sobre a coalhada. O sal influencia a taxa de proteólise do produto final, controla a taxa de crescimento bacteriano, reduzindo a fermentação de lactose, que pode alterar o sabor e a textura dos queijos. A quantidade de sal utilizada no processamento do queijo de coalho varia entre 0,5 a 2% do volume de leite (PERY, 2004; NASSU; MACEDO; LIMA, 2006).

1.7 Uso de peptidases vegetais na fabricação de queijos

Assim como a quimosina, a maioria das enzimas proteolíticas utilizadas na fabricação de queijos é do tipo aspártica, porém enzimas de outros grupos como serínicas e cisteínicas têm sido aproveitadas com essa finalidade (SHAH *et al.*, 2014). Há trabalhos que caracterizam extratos proteicos quanto à sua capacidade de coagulação do leite, como em

extratos contendo peptidases aspárticas nas flores de *Silybum marianum* (VAIRO-CAVALLI *et al.*, 2008), de *Onopordum acanthium* (BRUTTI *et al.*, 2012) e dos frutos de *Solanum eleaeagnifolium* (NESTOR *et al.*, 2012), com peptidases serínicas das flores de *Moringa oleífera* (PONTUAL *et al.*, 2012) e contendo peptidases do tipo cisteínicas das sementes de *Helianthus annuus* e *Albizia lebbek* (EGITO *et al.*, 2007).

Enzimas coagulantes vegetais são essenciais para a manufatura e a maturação em queijarias, este tipo de coagulante tem como característica produzir queijos com textura suave, sabor levemente amargo e firmeza semidura (ROSEIRO *et al.*, 2003).

Em estudo realizado com *Calotropis gigantea* foi observado que o extrato enzimático obtido do látex, tronco, folhas e flor, após 24 horas produziu coágulos de boa qualidade e queijo similar ao obtido por enzima comercial (ANUSHA; SINGH; BINDHU, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, o interesse em produtos naturais de plantas com aplicações biotecnológicas tem crescido rapidamente. Entre estas moléculas naturais se destacam as enzimas, por apresentarem especificidade, possuem alta atividade e não serem consumidas durante o processo. Existe uma grande diversidade de enzimas que são utilizadas na indústria, incluindo enzimas proteolíticas de origem vegetal. (GONZÁLEZ; BADILLO; BARRADAS, 2011). Fluidos laticíferos são riquíssimas fontes de enzimas proteolíticas e muitas destas enzimas têm sido estudadas em termos moleculares, enzimáticos, funcionais e em prospecção biotecnológica (FREITAS, 2010; KONNO, 2011; RAMOS *et al.*, 2014).

A produção de queijo coalho independente de suas características individuais, necessita da utilização de um agente coagulante do leite, comercialmente denominado de coalho. Estes produtos, comercializados por diversas marcas, têm em comum o princípio ativo que, através de sua ação proteolítica, processa adequadamente as caseínas do leite, especialmente a subunidade kappa (κ -caseína) (TAVARES & MALCATA, 2012). Esta especificidade de proteólise é um ponto crítico para a obtenção de um produto final aceitável ao paladar. A quimosina é capaz de promover a hidrólise ideal, em termos de especificidade e extensão de hidrólise, e é o principal componente ativo dos coalhos comercializados. Esta protease aspártica é obtida a partir de preparações de estômago de animais ruminantes o que implica em restrições de consumo por motivos religiosos (Islamismo e Judaísmo) e por hábitos alimentares (vegetarianos) (SHIEH *et al.*, 2009).

Adicionalmente, em virtude da grande demanda e consumo de queijos, a oferta de coalho não tem acompanhado as necessidades, esses fatores somados ao alto preço do coalho no mercado estimulam uma permanente prospecção por novas fontes enzimáticas que possam processar as caseínas do leite de modo a substituir a quimosina ou ser uma alternativa à sua utilização, produzindo queijos com qualidades comerciais aceitáveis (ROSEIRO, *et al.*, 2003; CORRONS, 2012).

As características sensoriais e a qualidade de um queijo estão relacionadas com os seguintes elementos: alimentação e linhagem dos animais; fonte do leite utilizado (caprinos, ovinos, bovinos etc.); condições do processo, como umidade e temperatura; e o tipo de agente coagulante empregado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar as atividades caseinolítica e coagulante de leite em preparações protéicas de fluidos laticíferos de *Calotropis procera*, *Cryptostegia grandiflora*, *Plumeria rubra*, *Carica papaya* e *Himatanthus drasticus*, utilizar a(s) preparação(ões) mais ativa(s) como coagulante vegetal para a produção de queijo e avaliar suas propriedades físico-químicas e organolépticas de maneira preliminar.

3.2 Objetivos específicos

- Coletar o látex de cinco espécies vegetais (*Calotropis procera*, *Cryptostegia grandiflora*, *Plumeria rubra*, *Carica papaya*, *Himatanthus drausticus*).
- Isolar as frações proteolíticas.
- Determinar as atividades proteolíticas específicas.
- Realizar ensaios de coagulação do leite.
- Avaliar o padrão de hidrólise das caseínas por eletroforese em gel de poliacrilamida.
- Produção dos queijos coalhos de leite bovino com as amostras de *C. procera* e *C. grandiflora*.
- Atividade proteolítica dos queijos feitos com *C. procera* e *C. grandiflora*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

Azocaseína, κ -caseína, papaína, L-cisteína, adjuvante de Freund completo e incompleto, IgG de cabra anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina, p-nitrofenil fosfato-dissódico e membrana de diálise com “cut off” de 8 KDa foram obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Acrilamida, bis-acrilamida, dodecil sulfato de sódio (SDS), persulfato de amônio, N,N,N',N' tetrametiletilenodiamino (TEMED), azul de bromofenol, dithiothreitol (DTT) e marcadores de massa molecular foram obtidos da GE HealthCare (São Paulo, Brasil). Quimosinas comerciais (Coalhopar[®] e Halamix[®]) foram obtidas no mercado local de Fortaleza, CE, Brasil. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico e obtido de diferentes empresas.

4.2. Material biológico

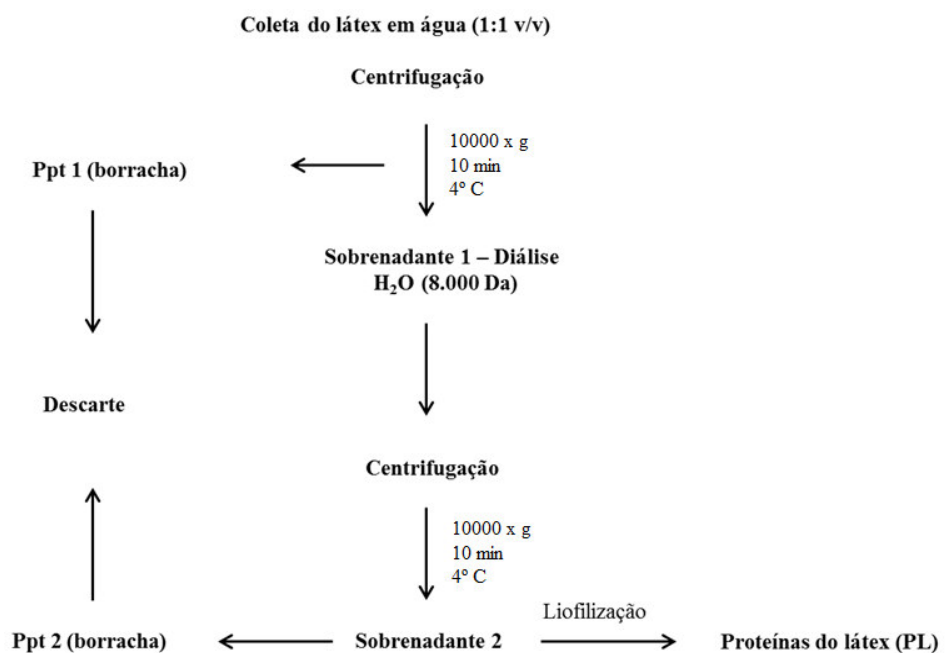
As frações proteicas dos látices de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Apocynaceae), *Plumeria rubra* L. (Apocynaceae), *Cryptostegia grandiflora* R.Br. (Apocynaceae), *Carica papaya* L. (Caricaceae) e *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. (Apocynaceae) foram coletadas de plantas não cultivadas e saudáveis localizadas próximas à região metropolitana de Fortaleza–CE (Brasil), predominantemente no período da manhã entre 06-09 horas. Todas as plantas foram identificadas e suas exsiccatas depositadas no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, Brasil, sob o número N. 32663 (*C. procera*), N. 15018 (*P. rubra*), N. 040409 (*C. grandiflora*) e N. 40408 (*H. drasticus*). As espécies estudadas neste trabalho possuem comprovante de registro para coleta no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) sob o número: 44054-19 e data de emissão: 23/04/2014. Também possui autorização de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético emitido pelo CNPq, com processo 010425/2014-4 e validade de 10/06/2014 a 01/06/2018.

4.3 Métodos

4.3.1 Coleta e fracionamento de látex

A coleta e fracionamento dos fluidos laticíferos foram realizados de acordo com os procedimentos descritos no trabalho de Freitas e colaboradores (2007). O látex de *C. papaya* foi coletado através de cortes longitudinais em frutos verdes, ao passo que em *C. procera* e *C. grandiflora* o ápice caulinar foi quebrado. O látex de *Himathantus drasticus* foi coletado através de incisões no caule, similar ao que é realizado na coleta do látex de *Hevea brasiliensis* (seringueira). Os fluidos laticíferos foram coletados em tubos de 50 mL do tipo Falcon, contendo água destilada (proporção 1:1, v:v). As suspensões foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram colhidos e submetidos à diálise exaustiva a 4° C contra água destilada, em membranas capazes de reter moléculas de até 8.000 Da. Posteriormente, para a separação da borracha, foi realizada nova centrifugação (10.000 x g por 10 minutos a 4 °C). Os sobrenadantes resultantes foram liofilizados e denominados de proteínas do látex (PL). Assim, as proteínas dos látices de *Calotropis procera*, *Plumeria rubra*, *Cryptostergia grandiflora*, *Carica papaya* e *Himatanthus drasticus* foram nomeadas de PLCp, PLPr, PLCg, PLCap e PLHd, respectivamente. O esquema de obtenção das frações proteicas pode ser visualizado na Figura 9.

Figura 9 – Esquema de obtenção da fração proteica do látex (PL)



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

4.3.2.1 Atividade proteolítica total

O substrato inespecífico azocaseína foi utilizado para investigar a atividade proteolítica total nas frações proteicas dos fluidos laticíferos em estudo (PLCp, PLCg, PLPr, PLHd e PLCap). As peptidases comerciais purificadas do tipo cisteínicas, papaína e bromelaína, foram utilizadas como controles positivos. Os ensaios foram conduzidos de acordo com a metodologia descrita por Freitas e colaboradores (2007), com algumas modificações. Inicialmente, 10, 15, 20, 25 e 30 μL de soluções das frações proteicas (2 mg/mL, em 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 6,5), contendo 40 μL de DTT 3 mM, um agente redutor capaz de ativar peptidases cisteínicas, foram, separadamente, incubadas por 10 minutos a 25 °C. O volume de tampão Tris-HCl 50 mM pH 6,5 foi calculado para se obter um volume final de 300 μL . Após este período, foram adicionados 200 μL de azocaseína 1%. Depois de 1 hora de incubação a 37°C, a reação foi parada com 300 μL de TCA 20% (ácido tricloroacético). Transferiu-se o sobrenadante obtido após centrifugação (10000 x g a 10 °C por 10 min) para um novo microtubo de 400 μL e 400 μL de hidróxido de sódio (NaOH) 2N foram adicionados. A absorção de luz foi medida a 420 nm em espectrofotômetro. O substrato ao ser degradado pelas peptidases libera caseína e a porção “azo” que funciona como cromóforo neste comprimento de onda. Aos brancos da reação, a azocaseína (substrato) foi adicionada somente após parada da reação com TCA. Uma unidade de atividade foi definida como o aumento na absorbância em 0,01 a 420 nm.

4.3.2.2 Efeito de diferentes ativadores de peptidases cisteínicas

Para determinar a capacidade de L-cisteína e ácido ascórbico de atuarem como ativadores de peptidases cisteínicas, diferentes volumes de ativadores (L-cisteína, ácido ascórbico e DTT) nas concentrações finais de 0,2; 0,5; 1, 2 e 3 mM foram adicionadas às misturas reacionais em substituição ao DTT, que por ser um composto químico tóxico, não pode ser adicionado em alimentos. A atividade foi determinada como descrito no item 4.3.2.1.

4.3.3 Atividade de coagulação do leite

Leite em pó desnatado Molico[®] foi dissolvido em 10 mM de CaCl_2 para uma concentração final de 10% (m/v) (ARIMA; YU; IWASAKI, 1970). Quantidades distintas (20, 30, 40, 50 e 60 μg) das proteínas laticíferas foram dissolvidas em 200 μL de tampão Tris-HCl

50 mM pH 6,5 contendo 1 mM do aminoácido L-cisteína como ativador. Em seguida, foram incubados com 2 mL de leite desnatado a 37 °C. A reação foi observada até que houvesse a formação de pequenas partículas de coágulo. Os Coalhos comerciais Coalhopar[®] e Halamix[®] foram utilizados como controles.

Uma unidade de atividade específica de coagulação do leite (AECL) foi definida como a quantidade de enzima, em miligramas capaz de coagular 10 mL de leite em 40 minutos (AHMED; BABIKER; 2010), de acordo com a seguinte equação (1):

$$AECL = \frac{\left(\frac{\text{Ativ. de coagulação}}{\text{mg}} \right)}{\text{mg (enzima)}} = \left[\frac{2400}{\text{tempo de coagulação (s)}} \times \text{fator de diluição} \right] \quad (1)$$

O efeito de diferentes temperaturas (37, 45, 55, 65 e 75° C por 10 minutos), da concentração de NaCl e de CaCl₂ (10, 50, 100, 200, 500 e 1000 mM) sob a atividade de coagulação do leite foram realizados em triplicatas determinadas como descrito acima.

4.3.4 Análise da hidrólise das caseínas

4.3.4.1 Preparação da caseína bovina completa

Leite bovino pasteurizado integral Maranguape[®] foi obtido em mercados locais e conservado a 4° C até o momento do uso. As caseínas foram obtidas por meio de precipitação isoelétrica, como descrito por Egito e colaboradores (2007), com pequenas modificações. O leite foi desnatado por meio de centrifugação (2100 x g a 30° C por 30 minutos). O sobrenadante foi acidificado com HCl 0,1 M até atingir o pH 4,6; novamente centrifugado nas condições descritas acima. O precipitado (caseinato de sódio) foi lavado com água destilada e centrifugado novamente. Este processo foi repetido mais duas vezes. A fração caseína foi dialisada exaustivamente contra água destilada a 4° C por 48 horas usando membrana de diálise com poros de 8000 Da e, em seguida, o material foi liofilizado para obtenção do pó.

4.3.4.2 Análise da hidrólise das caseínas por SDS - PAGE

A hidrólise das frações α, β e κ das caseínas, assim como da κ-caseína purificada foi realizada como descrito por Ahmed e colaboradores (2010), com sutis modificações. As misturas reacionais foram constituídas de 50 μL das frações proteicas (0,1 mg/mL,

dissolvidos em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 6,5; contendo 1 mM de L-cisteína) e 450 μ L da fração caseína total ou de κ -caseína purificada (5 mg / mL). Depois de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos a 37° C, em microtubos de 1,5 mL, uma alíquota de 50 μ L foi misturada com tampão de amostra que continha Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8; contendo 0,1% de SDS, 5% de 2-mercaptoetanol e traços de azul de bromofenol 0,02% para marcação da frente de corrida eletroforética. A mistura foi colocada em contato com água fervente por 5 minutos. As amostras foram aplicadas em um gel de SDS-PAGE 15% (m/v), como descrito por Laemmili (1970). Ensaios idênticos foram realizados com as quimosinas comerciais (Coalhopar[®] e Halamix[®]) utilizadas como controles positivos.

4.3.4.3 Determinação do sítio de clivagem na κ -caseína pelas peptidases laticíferas

Cada alíquota de 50 μ L das amostras das frações proteicas dos fluidos laticíferos de PLCp e PLCg a 0,1 mg/mL adicionadas de L-cisteína na concentração final de 1 mM e do coalho Coalhopar[®] a 1 mg/mL dissolvidas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 6,5 foram incubadas durante 30 minutos a 37 °C com 450 μ L de uma solução 5 mg/mL de κ -caseína dissolvida em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 6,5; totalizando 500 μ L. Alíquotas de 50 μ L foram colhidas a cada 5 minutos nos tempos de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos de reação, adicionadas a 10 μ L do tampão Tris-HCl 0.0625 M pH 6,8 contendo 2% de SDS na presença de 2-mercaptoetanol 5% e aquecidas a 100 °C por 10 min. As corridas eletroforéticas foram realizadas em 2 h e 30 min, a 15 mA por gel e mantidas a 25 °C. As proteínas foram coradas com 0,1% (m/v) de Coomassie Brilliant Blue R-350. O gel foi descorado em uma solução consistindo de água: ácido acético: metanol (6:1:3 v/v/v). As replicatas dos géis obtidos das amostras PLCp e PLCg foram separadas e comparadas com o controle Coalhopar[®] quanto à presença da banda proteica do peptídeo p- κ -caseína que tem massa molecular de 16 KDa. As bandas identificadas foram cuidadosamente recortadas com auxílio de um bisturi. Para a recuperação, as bandas excisadas foram eletroeluídas em um aparelho de eletroforese vertical em tubos, Biorad[®], modelo 422 electro-elute[®], nas seguintes condições: 200 V durante 2 horas a uma corrente de 10 mA por amostra aplicada. Aproximadamente 150 μ L das soluções eletroeluídas foram transferida para um microtubo de 1,5 mL junto a solução de TCA 20% em acetona a -20 °C, na proporção de 1:4 (v:v). A amostra foi centrifugada a 15000 x g por 20 minutos a 4 °C, em seguida o sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi lavado com 1 mL de acetona -20 °C, foi realizada uma nova centrifugação a 15000 x g por 10 minutos a 4 °C, de modo que esse procedimento foi repetido quatro vezes, por fim, o

precipitado foi secado a vácuo a 25 °C.

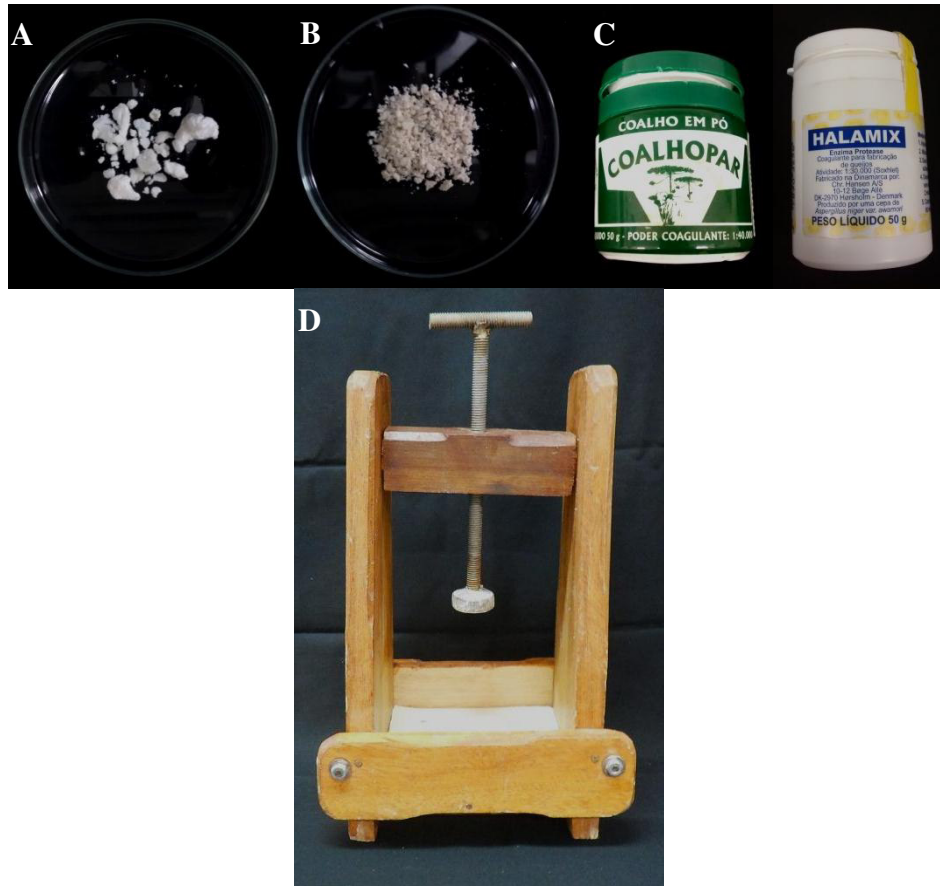
4.3.4.4 Espectrometria de massas

Os peptídeos resultantes da eletroeluição foram misturadas com ácido fórmico (0,1%) e submetidas à análise por espectrometria de massas através de um sistema de UPLC-ESI-Q-TOF em um aparelho Synapt HDMS mass spectrometer (Manchester, UK). Todas as análises foram realizadas utilizando ionização por electrospray no modo ESI (+) através da fonte NanoLockSpray.

4.4 Manufatura do queijo Coalho

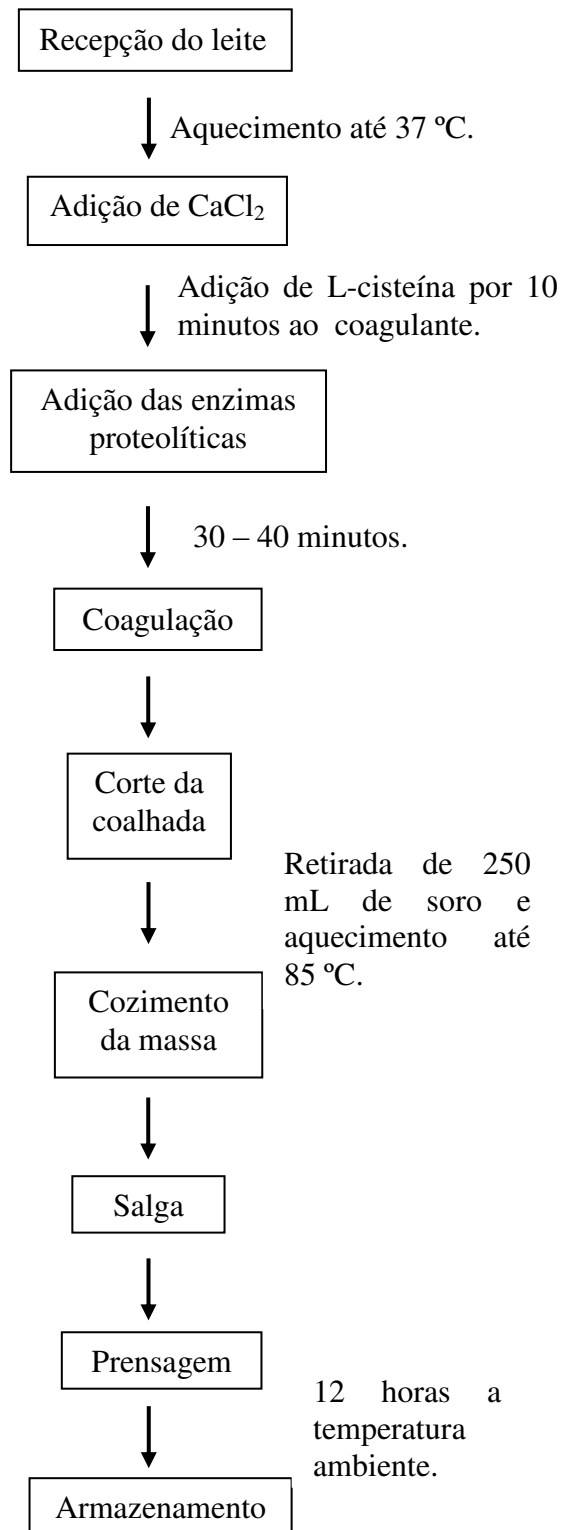
A produção de queijo do tipo coalho seguiu a metodologia descrita por Nassu, Macedo e Lima (2006) com pequenas adaptações. Para a ativação das peptidases do tipo cisteína, as frações dos látices de *C. procera* (9, 10, 11 e 15 mg) e *C. grandiflora* (30, 40 e 50 mg) (Figura 1A e 1B), foram dissolvidas em 15 mL de solução contendo 1 mM de L-cisteína a 25° C por 10 minutos. Os coalhos comerciais foram dissolvidos na concentração prevista pelo fabricante dos coalhos comerciais Coalhopar® e Halamix®. Separadamente, as frações proteolíticas foram adicionadas a 500 mL de leite pasteurizado bovino aquecido a 37 °C, contendo 50 mM de CaCl₂. Depois de 30 a 40 minutos à temperatura ambiente, o coágulo formado foi manualmente cortado em cubos, perfazendo duas fases: a coalhada e o soro. Parte do soro (250 mL) foi separada e aquecida a 85° C por 10 minutos, 10 gramas de sal de cozinha foram dissolvidos no soro aquecido e a mistura adicionada novamente a massa de coalho para a salga da coalhada. O preparado foi gentilmente mexido por 5 minutos e a massa foi acondicionada em fôrmas perfuradas e envolvidas em lenço de trama fina. Com auxílio de uma prensa artesanal (Figura 2D) adequada para queijos de 0,2 a 1 quilo foi realizada a dessoragem por um período de 12 horas a temperatura ambiente. O fluxograma da produção de queijo pode ser visto na figura 11.

Figura 10 – Insumos e equipamento utilizados para produção de queijo coalho. (A) pó liofilizado de PLCp, (B) pó liofilizado de PLCg, (C) coalhos comerciais e prensa (D).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2016).

Figura 11 – Fluxograma do processo de produção de queijo coalho.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

4.5 Atividade proteolítica dos queijos

Os queijos produzidos PLCp, PLCg e Coalhopar[®] foram liofilizados e as proteínas presentes em 1 grama dos queijos foram extraídas em 10 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 6,5; por 10 minutos a 8 °C em maceração com almofariz e pistilo. A suspensão foi centrifugada a 5000 x g por 10 minutos a 4 °C, e diferentes alíquotas do sobrenadante (50, 100 e 200 µL) foram incubadas com 1% de azocaseína (m/v). A atividade proteolítica foi determinada como descrita no item 4.3.2. Ensaio idênticos foram realizados com queijos manufaturados com quimosina comercial (Coalhopar[®]). As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra, 30 µL foram aplicados em gel de eletroforese 12,5% (m/v) contendo gelatina 0,1% (m/v). Os controles enzimáticos de PLCp e PLCg também foram adicionados. Os géis foram lavados com Triton X-100 2,5% (v/v) durante 10 minutos para a retirada do SDS e renaturação das proteínas. Os géis foram incubados por 12 horas a 37 °C em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 6,5; contendo 1 mM de L-cisteína. Em seguida, os géis foram corados com uma solução de *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1% (m/v).

4.6 Dosagem de proteínas solúveis

A concentração de proteínas solúveis presentes em 1 grama dos queijos liofilizados foi realizada através do método de Bradford (1976). Essa massa de queijo foi macerada em 10 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 6,5; durante 10 minutos e feita a diluição no mesmo tampão de extração na proporção 1:150. Foram adicionados a 2,5 mL do reagente de Bradford alíquotas contendo um volume de 100 µL das amostras dos queijos de *C. procera* (9, 10, 11 e 15 mg) e de *C. grandiflora* (40 e 50 mg), e após 10 minutos foram realizadas as leituras em espectrofotômetro (Ultrospec 1000 Amersham Pharmacia) no comprimento de onda de 595 nm. Albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada para obtenção de uma curva padrão.

4.7 Obtenção de anticorpos

Para obtenção dos anticorpos anti-PLCp e anti-PLCg foi conduzido ensaio imunológico baseado na técnica de ELISA, de modo a detectar a presença de proteínas laticíferas remanescentes nos queijos de PLCp e PLCg. Um miligrama de proteína de cada látex foi dissolvido em 0,5 mL de solução salina estéril a 0,9% (m/v) e misturada a 0,5 mL de adjuvante completo de Freund como descrito por Freitas e colaboradores (2015). Previamente

ao processo de imunização, foi coletada uma amostra de sangue dos animais para obtenção o soro pré-imune. Para induzir a sensibilização (dia 0), separadamente, cada suspensão (1 mL) foi injetada, por via intramuscular na pata traseira de dois coelhos machos adultos da espécie *Oryctolagus cuniculus*, raça Nova Zelândia com 16 semanas de idade cada um, adquiridos no coelhário do Departamento de Zootecnia (UFC). As doses de reforço foram aplicadas em intervalos (21, 35 e 42 dias) da mesma dose, porém com a adição de adjuvante de Freund incompleto. Amostras do soro foram coletadas a partir do dia 21 e combinadas em um *pool* para obtenção de anticorpos anti-PLCp e anti-PLCg. Os anticorpos foram mantidos a -20 °C até o uso no ensaio de ELISA. Os coelhos foram mantidos a temperatura de aproximadamente 25 °C e em gaiolas apropriadas. Os animais foram aclimatados em biotério por duas semanas antes do início dos experimentos. Os procedimentos experimentais e manuseio dos animais foram feitos de acordo com os guias aprovados pelo Comitê institucional de ética animal da Universidade Federal do Ceará.

4.8 Detecção de proteínas laticíferas nos queijos

O imunoenensaio de ELISA foi realizado utilizando anticorpos anti-PLCp e anti-PLCg IgG como anticorpos primários (diluição 1:10000) e IgG anti IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (diluição 1:5000) como anticorpos secundários. Os experimentos foram conduzidos em placas de 96 poços usando como substrato p-nitrophenil fosfato de sódio (5 mg/mL). A reação foi quantificada pela absorbância a 405 nm por meio de um leitor de ELISA (Biotrak II Plate Reader, Amersham Biosciences).

4.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism Software (Versão 5,0; San Diego, CA), obtida por análise variância (ANOVA, n=3), seguida pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas. $P < 0,05$ foi considerado sendo estatisticamente diferente.

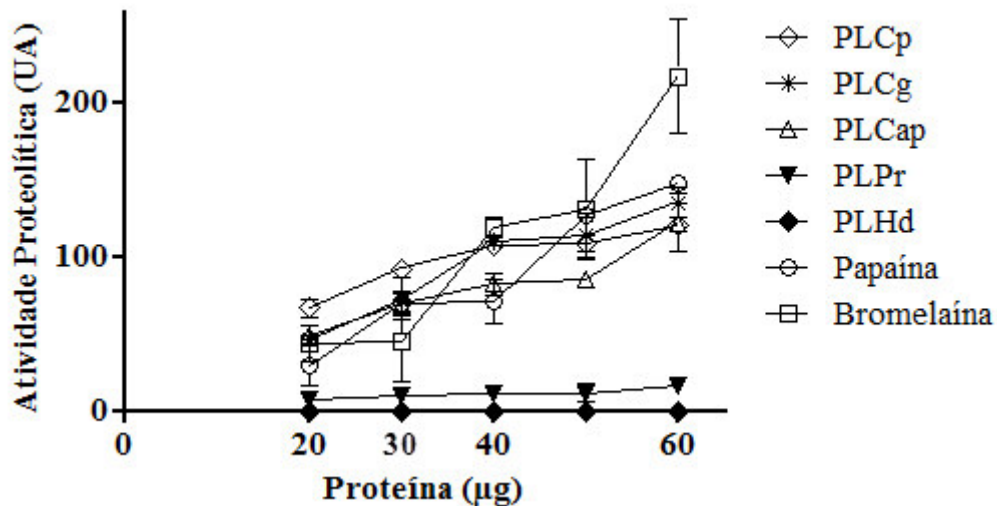
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade proteolítica dos látices

O fracionamento dos fluidos laticíferos obtidos das plantas em estudo foi realizado através de um eficiente protocolo, baseado em etapas sucessivas de centrifugação e diálise, de modo a resultar em frações livres de borracha e pequenos metabólitos, e rica em proteínas solúveis. As frações denominadas de PL (proteínas do Látex) foram analisadas quanto suas atividades proteolíticas e de coagulação do leite.

A presença de peptidases nas frações proteicas de *C. procera*, *C. grandiflora*, *P. rubra*, *C. papaya* e *H. drasticus* foi mensurada em ensaio colorimétrico na presença do substrato inespecífico, azocaseína, contendo DTT como agente redutor (Figura 12). As enzimas Bromelaína e Papaína, utilizadas como controles positivos, demonstraram um efeito dose dependente na atividade proteolítica, ou seja, foram capazes de causar incremento na atividade com o aumento da quantidade de proteína aplicada. Tanto as frações proteicas de *C. procera* como de *C. grandiflora* possuem alta atividade proteolítica *in vitro*, apresentando efeito similar à fração proteica do látex de *C. papaya* e das enzimas purificadas, papaína e bromelaína. A atividade proteolítica da fração proteica de *P. Rubra*, foi muito baixa quando comparada com as outras frações. As proteínas do látex de *H. drasticus* não exibiram atividade proteolítica, mesmo na maior dose aplicada no ensaio (60 µg).

Figura 12 – Atividade proteolítica das frações proteicas do látex (PL) de *C. procera*, *C. grandiflora*, *P. rubra*, *H. drasticus*, *C. papaya* e das enzimas purificadas bromelaína e papaína, utilizando azocaseína 1% (m/v) como substrato e DTT 3 mM como ativador.



Fluidos laticíferos têm sido descritos como fontes ricas de peptidases do tipo serínicas e cisteínicas (TEIXEIRA *et al.*, 2008; KONNO, 2011). Nos fluidos laticíferos de *C. papaya* (AZARKAN *et al.*, 2003; LLERENA-SUSTER; PRIOLO; MORCELLE, 2011) *C. procera* (RAMOS *et al.*, 2013; KWON *et al.*, 2015) e *C. grandiflora* (FREITAS *et al.*, 2010; VIANA *et al.*, 2013), somente peptidases do tipo cisteínicas têm sido relatadas. No látex de *Himathanthus drasticus* há predominância de peptidases serínicas (MATOS, 2013) já o látex de *P. rubra* é composto por uma combinação de peptidases cisteínicas e serínicas (Freitas *et al.*, 2007; 2010). Como pode ser observado na Figura 12, DTT não foi capaz de ativar as peptidases de *H. drasticus* e resultou em uma baixa ativação em *P. rubra*. Matos (2013) demonstrou que a fração laticífera de *H. drasticus* é pobre em peptidases e possui baixa atividade proteolítica em pH 6 (0,2 UA/µg de proteína). Embora não tenha sido detectada atividade proteolítica no extrato proteico das flores de *Moringa oleifera*, estas peptidases demonstraram atividade caseinólítica (PONTUAL *et al.*, 2012). Desse modo, o estudo de viabilidade das peptidases de *H. drasticus* e *P. rubra* para coagulação do leite não foi abortado pela baixa atividade proteolítica observada na Figura 12.

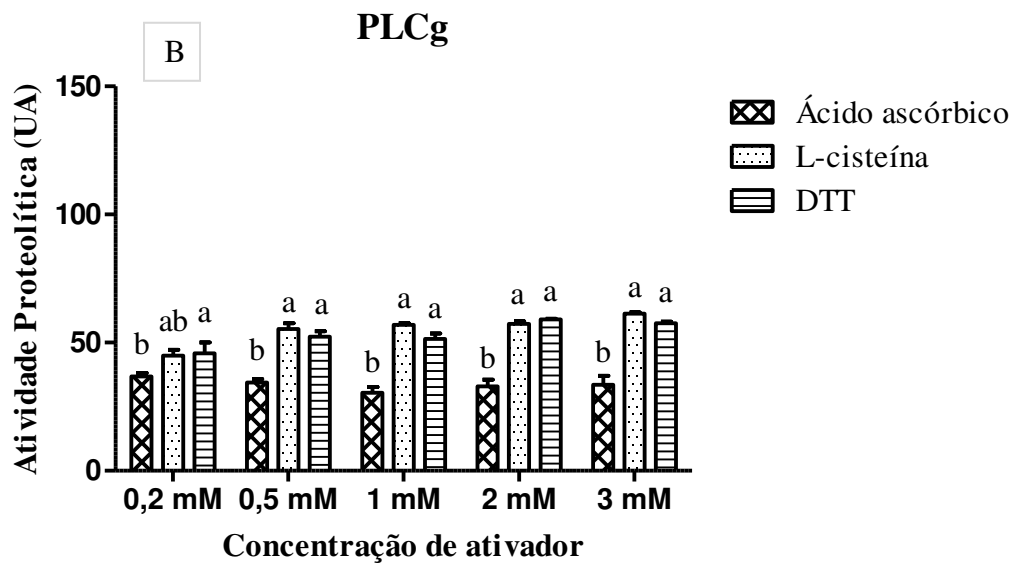
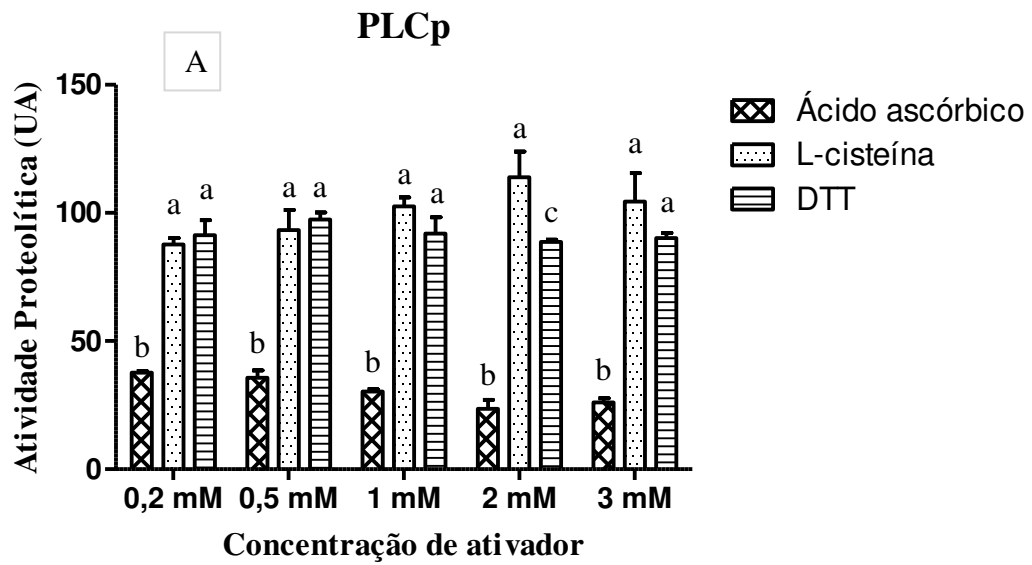
Visando contornar o problema causado pelo uso de DTT, um composto tóxico por ingestão, foi realizado um ensaio de atividade proteolítica utilizando ativadores alternativos passíveis de serem utilizados em alimentos como a L-cisteína, um aminoácido, e o ácido

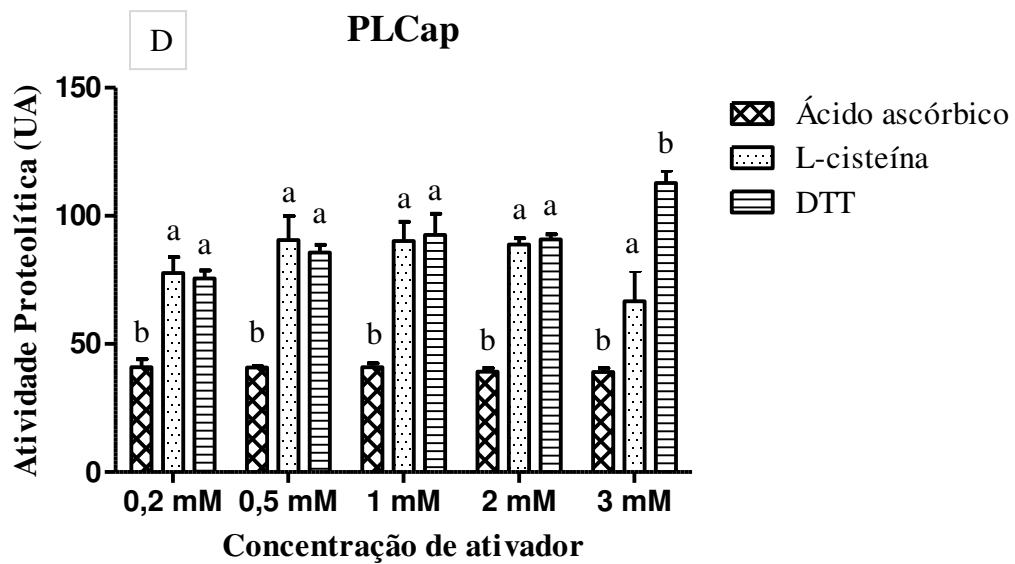
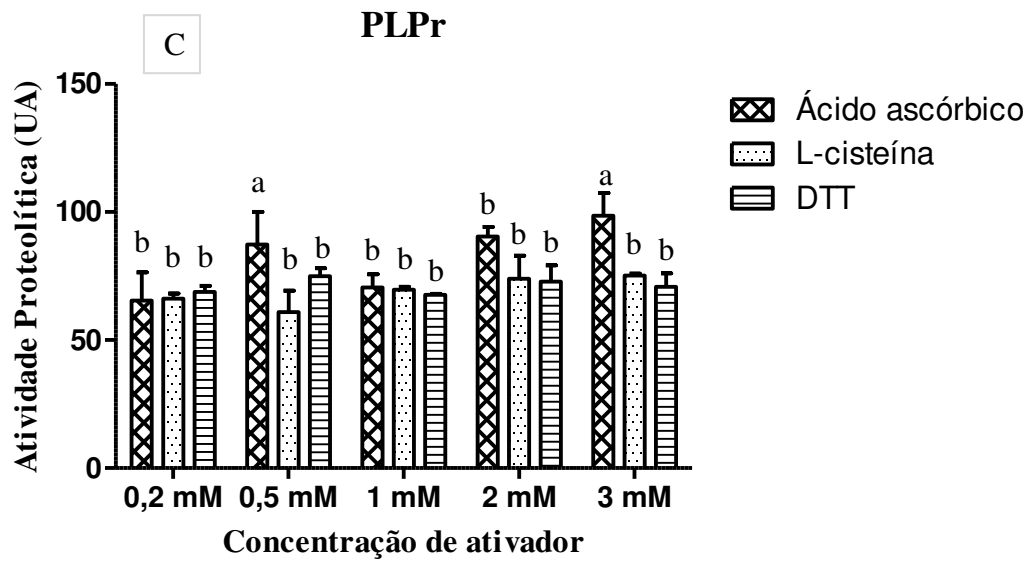
ascórbico, a vitamina C para a ativação de peptidases cisteínicas durante a produção de queijos.

As peptidases cisteínicas presentes nas frações laticíferas de *C. procera* e *C. grandiflora* foram efetivamente ativadas com os agentes redutores DTT e L-cisteína (Figura 13 A). As melhores concentrações testadas dos ativadores foram 0,5 e 1 mM tanto para o DTT como para L-cisteína, ativando as peptidases de PLCp e PLCg (Figura 13 A e B). O ácido ascórbico não foi capaz de ativar peptidases de PLCp (Figura 13 A), por ser um antioxidante redox não foi capaz de ativar peptidases cisteínicas (GROTEN *et al.*, 2006). Resultados similares foram obtidos quando as frações proteicas de *C. grandiflora* e *C. papaya* foram testadas (Figura 13 B). O ácido ascórbico é um agente redutor e em pHs próximos a 7, assume a sua forma ionizada, o ascorbato. As peptidases do látex de *P. rubra* tiveram uma discreta ativação por ácido ascórbico na concentração de 0,5; 2 e 3 mM deste agente redutor, enquanto DTT e L-cisteína não demonstraram nenhum efeito ativador.

O aminoácido essencial L-cisteína não é tóxico, pode ser utilizado como aditivo em alimentos (ZHAO *et al.*, 2014) e possuiu atividade similar ao DTT. Portanto foi utilizado em todos os ensaios de coagulação do leite e produção dos queijos na concentração de 0,5 mM (Figura 13). Embora possua atividade como ativador de peptidases, L-cisteína pode ainda ser utilizada como suplemento nutricional na manufatura de queijos. Além disso, o uso deste aminoácido na produção de queijos ainda não foi relatado na literatura, fato que abre novas perspectivas para a investigação científica dessa substância na qualidade deste produto.

Figura 13 – Efeito de diferentes agentes redutores sobre a atividade proteolítica de *C. procera* (A), *C. grandiflora* (B), *P. rubra* (C) e *C. papaya* (D).



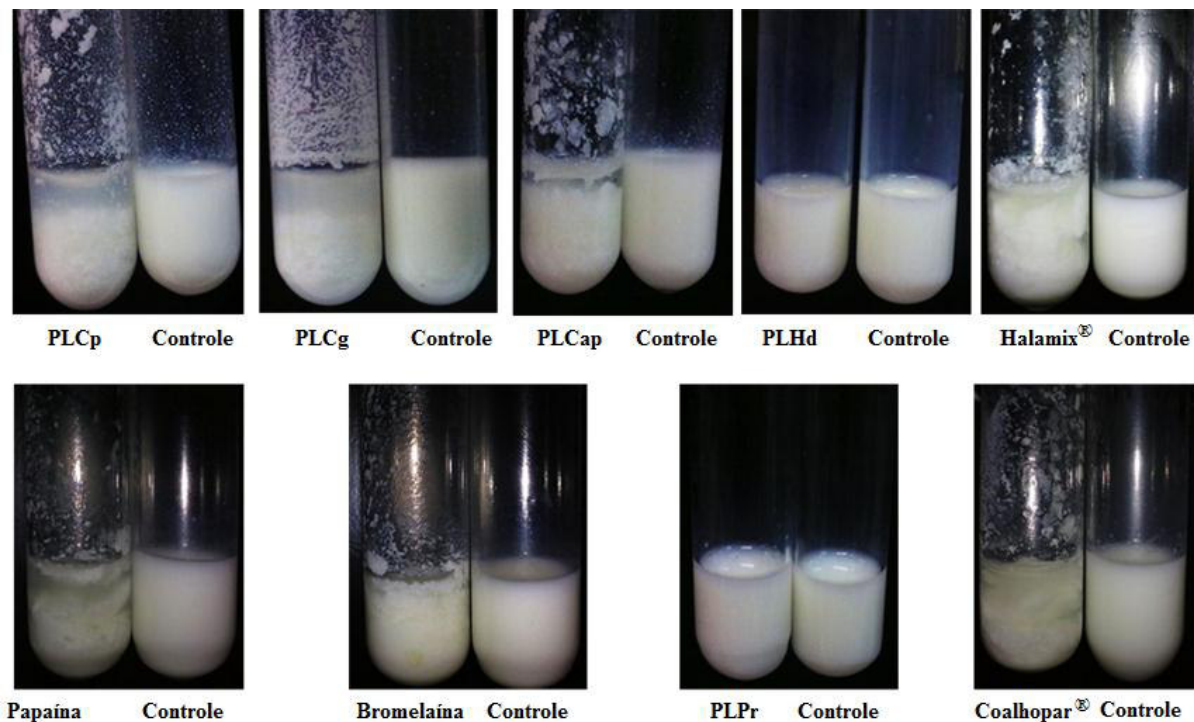


Legenda: Letras Diferentes (a,b) indicam que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos ($n = 3$, ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

5.2 Atividade de coagulação do leite

As frações proteolíticas de *C. procera*, *C. grandiflora*, *C. papaya*, papaína e bromelaína foram capazes de produzir coalhadas similares aos coalhos comerciais (Coalhopar[®] e Halamix[®]). As coalhadas permaneceram estáveis depois de 12 horas a 25 °C e não se dissolveram. Isto é importante porque os extratos supostamente são capazes de hidrolisar a κ -caseína, porém não hidrolisam a massa formada pelo leite coagulado. *P. rubra* e *H. drasticus* não foram capazes de coagular o leite mesmo na maior dose testada (60 μ g) (Figura 14). Curiosamente, o aspecto da coalhada formada foi diferente entre os preparados enzimáticos testados, o que pode indicar a atividade específica de cada peptidase. Queijos preparados com coagulantes vegetais têm como característica textura suave e sabor levemente amargo (ROSEIRO *et al.*, 2003). Quanto maior a atividade proteolítica de um coagulante, menor será a qualidade da coalhada e maior a probabilidade de ocorrer proteólise durante a etapa de maturação (SHAH *et al.*, 2014) comprometendo a textura do produto.

Figura 14 – Aspecto geral da atividade de coagulação do leite pelas peptidases laticíferas, das enzimas purificadas bromelaína e papaína e dos coalhos comerciais Halamix[®] e Coalhopar[®]

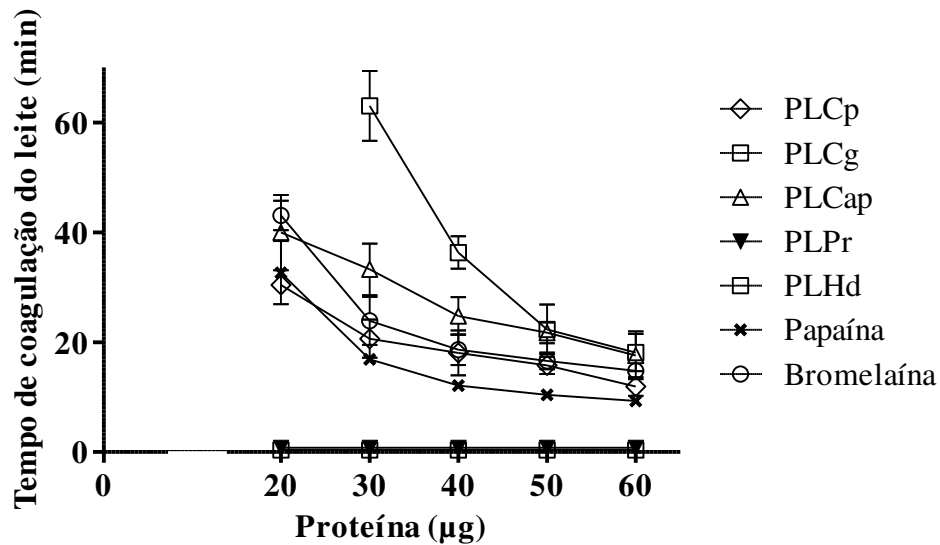


Não foram observadas diferenças significativas na capacidade de coagulação do leite quando utilizados leite integral ou desnatado. O leite em pó desnatado foi utilizado em todos

os ensaios de coagulação por que possibilitou melhor visualização dos coágulos formados durante a análise do tempo de coagulação. Outros trabalhos também fizeram uso deste tipo de leite (EGITO *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2013; MAHAJAN; CHAUDHARI, 2014).

Todas as frações proteolíticas apresentaram atividade de coagulação do leite dose-dependente, sendo a quantidade de 60 µg de proteína considerada a mais adequada para coagular 2 mL de leite em menor tempo (Figura 15). Na dose inicial de 20 µg, as peptidases de PLCg não foram capazes de coagular o leite, fato que só ocorreu a partir de 30 µg de proteína aplicados. O intervalo de tempo para a maior dose testada (60 µg) da maioria das amostras que demonstraram atividade de coagulação do leite variou entre 10 e 20 minutos. Os coalhos comerciais Coalhopar[®] e Halamix[®] coagularam o leite em 15 e 20 minutos, respectivamente, indicando que o tempo de coagulação e a dose final estão adequadas. Beka e colaboradores (2014) demonstraram que as peptidases da polpa do fruto *Balanites aegyptica* eram capazes de diminuir o tempo de coagulação do leite com o aumento da quantidade de extrato proteolítico aplicado, no qual 20 µg do extrato proteico foi capaz de coagular 1 mL de leite em aproximadamente 100 minutos. 50 µg de actinidina, uma peptidase cisteínica extraída e purificada a partir dos frutos de *Actinidia deliciosa*, foi capaz de coagular 1 mL de leite em 35 minutos (GROZDANOVIC; BURAZER; GAVROVIC-JANKULOVIC, 2013). O tempo de coagulação do leite também foi reduzido com o aumento da quantidade das peptidases das frutas de *Solanum esculentum*, *Solanum macrocarpon* e *Solanum melongena* (GUIAMA *et al.*, 2010a)

Figura 15 – Tempo de coagulação do leite após adição de diferentes quantidades das peptidases laticíferas, enzimas purificadas bromelaína e papaína.



As atividades específicas de coagulação do leite (AECL) e as atividades proteolíticas específicas (AP) das frações proteicas dos látices, de papaína e duas quimosinas comerciais (Halamix[®] e Coalhopar[®]) são mostrados na Tabela 1. A razão da atividade de coagulação do leite sob a atividade proteolítica específica (AECL/AP) é um importante indicador usado para determinar o potencial de peptidases como coagulantes para a manufatura de queijos (ARIMA *et al.*, 1970). Isso significa que um bom coagulante possui alto valor de AECL/AP, pois apresenta alta atividade coagulante do leite e baixa atividade proteolítica, significando em menor hidrólise das caseínas. Dentre todas as amostras, os melhores resultados foram obtidos pela papaína (1880 AECL/AP) e PLCp (1788,3 AECL/AP). Resultados similares foram observados para uma peptidase cisteínica do rizoma de gengibre (1653 AECL/AP) (HASHIM *et al.*, 2011). Outras peptidases do tipo cisteínicas de plantas como as de kiwi (Actinidina) (Torres *et al.*, 2010), do látex de *Vasconcellea quercifolia* (GROZDANOVIC; BURAZER; GRAVOVIC-JANKULOVIC, 2013) e do látex de *Euphorbia microsciadia* (Microsciadin) (REZANEJADA *et al.*, 2015) demonstraram potencial como agentes capazes de coagular o leite. Muito embora o tipo de peptidase mais utilizado na indústria queijeira seja do tipo aspártica, outros tipos têm sido relatadas como passíveis desta aplicação como a Neriifolin S, extraída do fluido laticífero de *Euphorbia neriifolia*, que é uma peptidase do tipo serínica (YADAV, *et al.*, 2012). Quanto à atividade específica de coagulação do leite, plantas da espécie *Calotropis gigantea* demonstraram possuir peptidases no látex com capacidade de

coagular o leite em nível similar à *C. procera*, 450 UA/mg (ANUSHA; SINGH; BINDHU, 2014) e 566,3 UA/mg (Tabela 1).

Tabela 1 – Atividades de coagulação do leite e proteolítica das frações laticíferas e dos coagulantes comerciais.

Enzima	AECL^a (UA/mg)	AP^b (UA/mg)	Taxa (AECL/AP)
Frações proteicas do látex			
<i>Calotropis procera</i>	566,3 ± 86,9	0,31 ± 0,04	1788,3
<i>Carica papaya</i>	394,3 ± 11,9	0,29 ± 0,02	1359,6
<i>Cryptostegia grandiflora</i>	404,2 ± 10,6	0,35 ± 0,09	1154,8
<i>Himatantus drausticus</i>	Nd [*]	Nd [*]	-
<i>Plumeria rubra</i>	Nd [*]	0,03 ± 0,01	-
Peptidases purificadas			
Papaína	720,7 ± 47,3	0,38 ± 0,06	1880,0
Coalhos comerciais			
CoalhoPar®	415,3 ± 30,6	Nd [*]	-
Halamix®	226,3 ± 41,2	Nd [*]	-

Legenda: ^a AECL: Atividade específica de coagulação do leite. ^b AP: Atividade proteolítica específica. Nd^{*} = Não detectada.

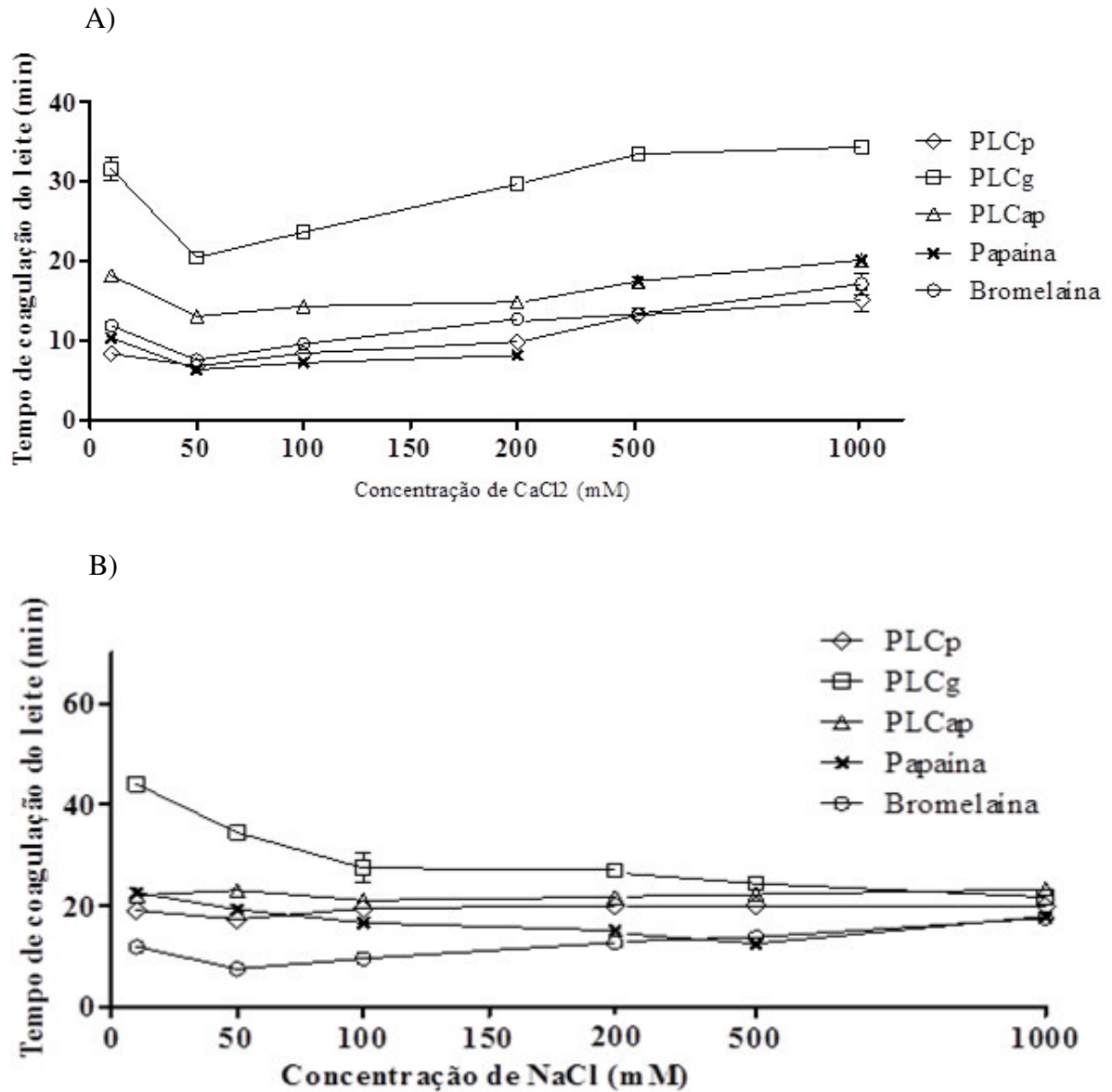
A concentração de íons como cálcio e sódio pode representar um importante parâmetro a ser mensurado, já que a adição de Na⁺, Cl⁻ e Ca²⁺ ao sistema, pode acarretar na diminuição da solubilidade da amostra proteica levando à precipitação ou ainda podem afetar na atividade proteolítica, diminuindo assim a atividade coagulante do leite (AHMED; BABIKER; MORI, 2010). Visto que ambos são utilizados durante a manufatura do queijo e que algumas enzimas com atividade de coagulação do leite podem ser inativadas por estas espécies químicas carregadas (SILVA *et al.*, 2013) o efeito das concentrações de NaCl e CaCl₂ foi avaliado sob a coagulação do leite (Figura 16 A e B). Todas as amostras demonstraram máxima atividade de coagulação do leite na concentração final de 50 mM de CaCl₂. Em concentrações maiores (100 – 1000 mM), houve aumento do tempo de coagulação do leite. Entretanto, mesmo na concentração de 1 M de cloreto de cálcio, o tempo de coagulação foi similar ao observado quando utilizada concentração de 10 mM de CaCl₂ para todas as amostras de peptidases estudadas (Figura 16 A). De modo parecido, o extrato dos frutos de *Bromelia hieronymi*

demonstrou melhor capacidade de coagular o leite na concentração de 50 mM de CaCl_2 (BRUNO *et al.*, 2010).

Já foi reportado na literatura que o tempo de coagulação do leite é dependente da adição de cloreto de cálcio, porém acarreta em aumento no tempo de coagulação em concentrações superiores a 1 M, fato verificado utilizando o coalho de bezerro (FAMELART; GRAET; RAULOT, 1999), extrato proteolítico das sementes de *Withania sp.* (NAZ; MASUD; NAWAZ, 2009) e de *Solanum dubium* (AHMED, *et al.*, 2010). CaCl_2 tem por finalidade melhorar a coagulação do leite pela correção da insolubilidade de sais de cálcio que ocorre durante a pasteurização, além disso contribui para a formação de uma coalhada mais firme e compacta, evita a perda de sólidos no soro, reduz o tempo de coagulação e melhora a expulsão do soro (EGITO *et al.*, 2007).

A presença de NaCl foi capaz de diminuir o tempo de coagulação do leite em *C. grandiflora* e papaína. Na maior concentração testada (1 M de NaCl), a atividade relativa de *C. grandiflora* e Papaína foi 152% e 122%, respectivamente, quando comparados na concentração de 10 mM de NaCl (Figura 16 B). Resultados similares foram observados com as peptidases da semente de uma *Solanaceae*, onde 2 M de cloreto de sódio foi um estimulador da atividade enzimática (AHMED; BABIKER; MORI, 2010). Máxima atividade de coagulação do leite foi obtida após a adição de uma solução de 5% de NaCl às peptidases de nove espécies do gênero *Solanum* (GUIAMA *et al.*, 2010b). Por outro lado, a atividade de coagulação do leite de *C. procera* e *C. papaya* não se alterou mesmo com 1 M de NaCl (Figura 16 B). Esses resultados sugerem novamente que as peptidases do látex de *C. procera* e *C. grandiflora* podem ser boas candidatas para utilização na produção de queijos, porque também é conhecido que NaCl pode ser adicionado a uma das etapas da manufatura de queijos com vários objetivos, entre eles, alterar o sabor e a sinérese da massa, controlar o crescimento microbiano e a atividade enzimática de outras proteínas presentes no leite como lipases e peptidases (GUINEE; FOX, 2004, DE PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009).

Figura 16 – Efeito de diferentes concentrações de CaCl_2 (A) e NaCl (B) no tempo de coagulação do leite pelas peptidases de *C. procera*, *C. grandiflora*, *C. papaya* e as enzimas purificadas Bromelaína e Papaína.

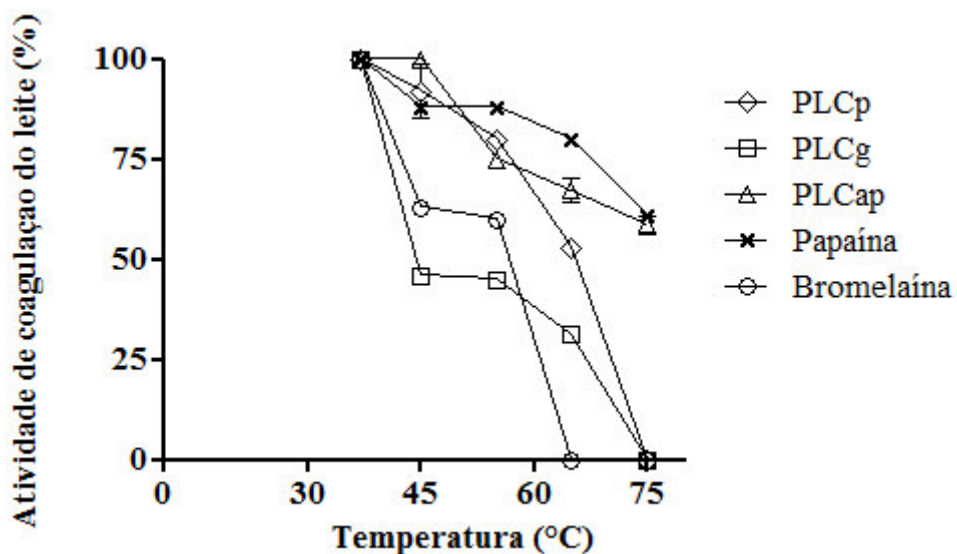


As frações laticíferas de *C. procera* e *C. grandiflora* demonstraram atividade coagulante máxima do leite a 37 °C e uma diminuição de 25% e 55%, respectivamente, após pré-tratamento a 55 °C por 10 minutos (Figura 17). Papaína começou a sofrer desnaturação entre 45-55 °C, de acordo com estudos sobre desnaturação térmica que utilizaram escaneamento por calorimetria e métodos espectrofotométricos (SUMNER *et al.*, 1993).

Excetuando-se as peptidases de *C. papaya* e Papaína, todas as amostras analisadas perderam a atividade de coagulação do leite após tratamento a 75 °C por 10 minutos (Figura 17). Peptidases das flores de *Moringa oleifera* também foram inativadas em temperaturas entre 60-70 °C (PONTUAL *et al.*, 2012). Todavia, enzimas que possuem capacidade de coagular o leite de diferentes plantas como *Solanum esculentum*, *S. melongena* e *S. macrocarpon* mantiveram a atividade coagulante permanecendo estáveis mesmo após aquecimento a 70 °C (GUIAMA *et al.*, 2010a). A peptidase religiosin B, purificada do látex de *Ficus religiosa*, demonstrou atividade de coagulação do leite mesmo após ser aquecida a 60 °C (KUMARI; SHARMA; JAGANNADHAM, 2012).

Estabilidade térmica e de pH são importantes propriedades bioquímicas que dirigem a escolha de enzimas que podem ser usadas em aplicações biotecnológicas diversas. Entretanto, um coagulante com alta estabilidade térmica e de pH pode resultar em hidrólise extensiva das proteínas do leite, resultando em queijos com sabor amargo, além de outras características comerciais indesejadas (AHMED *et al.*, 2009; LEMES *et al.*, 2016). Um dos procedimentos usados no Brasil para a produção de queijo coalho é a remoção de parte do soro, da coalhada seguido do aquecimento a 80 °C, o qual é novamente adicionado à coalhada objetivando seu cozimento (NASSU; MACEDO; LIMA, 2006). Dessa forma, a inativação de peptidases a 80 °C pode evitar uma hidrólise extensiva das caseínas do leite durante a etapa de maturação do queijo, a qual pode modificar propriedades do queijo como textura e sabor.

Figura 17 – Efeito da temperatura na atividade de coagulação do leite pelas peptidases de *C. procera*, *C. grandiflora*, *C. papaya* e as enzimas purificadas bromelaína e papaína.

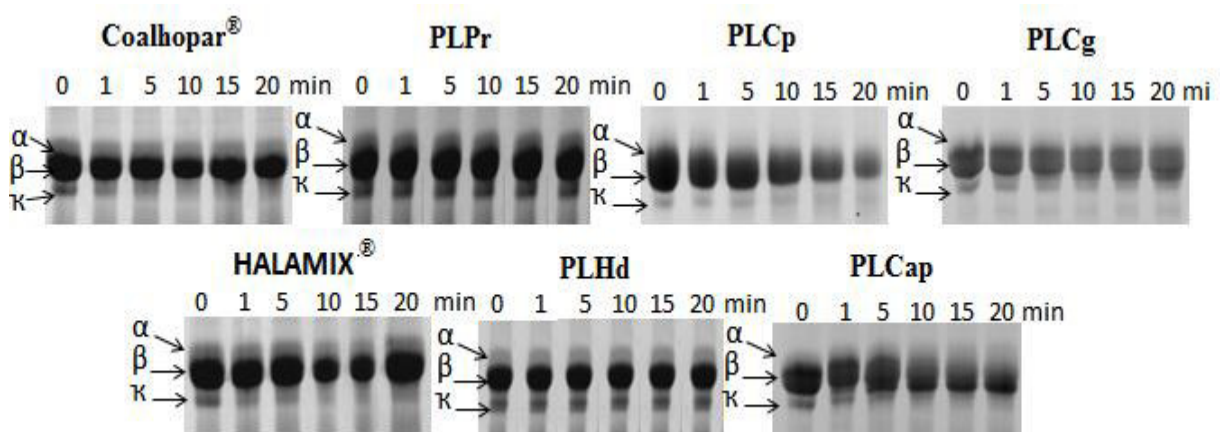


5.3 Hidrólise das caseínas por peptidases do látex

A extensão de hidrólise das subunidades α , β e κ da molécula de caseína pelas peptidases laticíferas foi analisada por SDS-PAGE (Figura 18). As peptidases dos látices de *C. procera*, *C. grandiflora* e *C. papaya* exibiram inespecificidade em relação às subunidades da caseína após 30 minutos de incubação. Entretanto, os coagulantes comerciais (Coalhopar[®] e Halamix[®]) foram mais específicos, clivando preferencialmente a banda referente à κ -caseína. Peptidases de *P. rubra* e *H. drasticus* não foram capazes de hidrolisar as três caseínas. Pontual e colaboradores (2012) também verificaram inespecificidade de hidrólise das peptidases de *Moringa oleifera* às caseínas α , β e κ . As sementes de *Albizia lebeck* e *Helianthus annus* foram capazes de hidrolisar κ -caseína, mas também as α e β caseínas (EGITO *et al.*, 2007).

A degradação κ -caseína está diretamente envolvida na formação da coalhada, uma hidrólise específica ou menos extensiva leva à formação de uma coalhada mais firme (BRUNO *et al.*, 2010)

Figura 18 – SDS-PAGE (12.5%) da hidrólise das caseínas bovinas pelas peptidases dos látices e de coalhos comerciais em função do tempo. Em detalhe as subunidades α , β e κ da caseína.



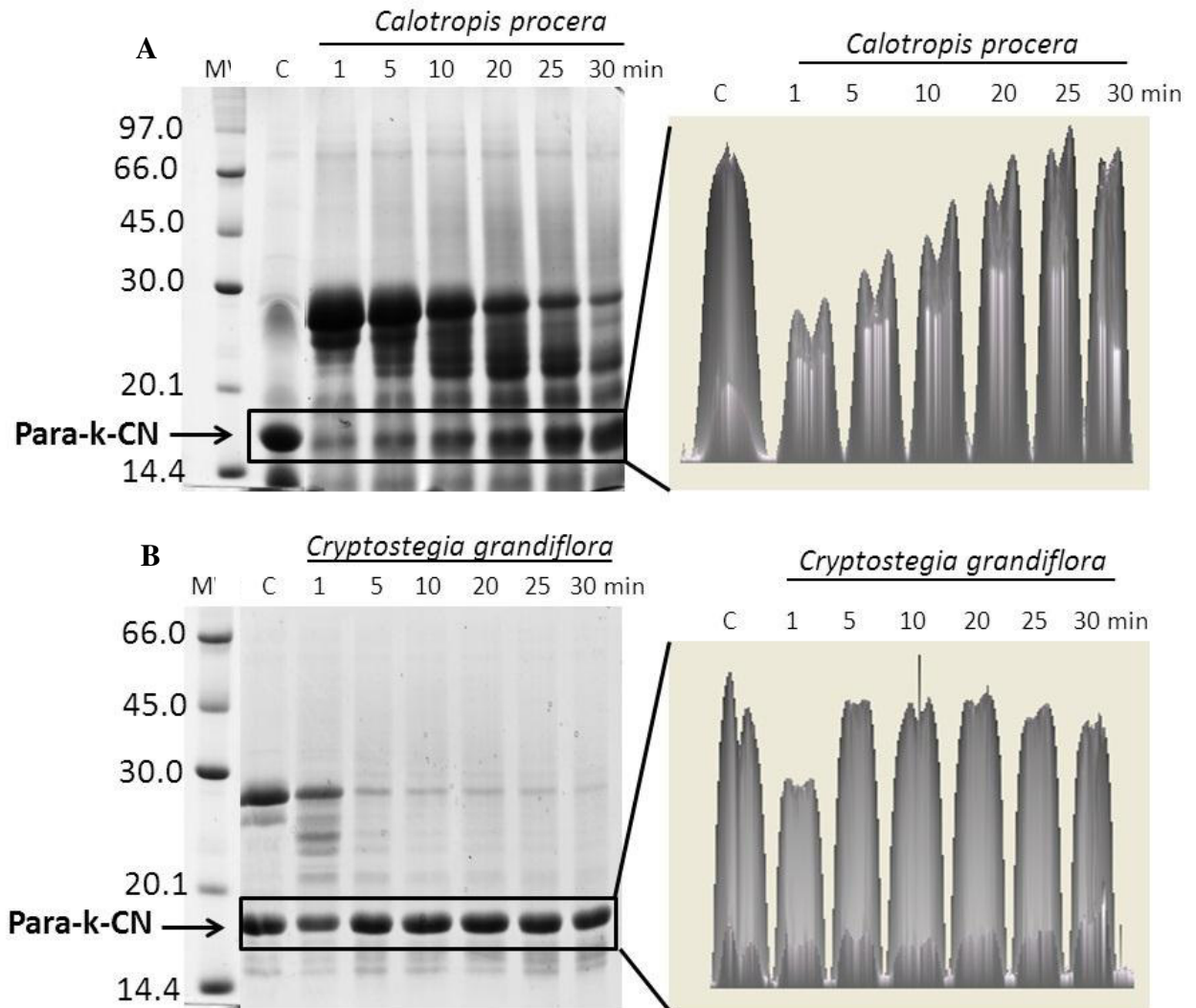
A qualidade dos queijos, incluindo características sensoriais como: sabor, odor e textura, podem ser refletidas pela capacidade de hidrolisar especificamente a κ -caseína. Quimosina comercial é capaz de clivar, especificamente, entre os resíduos de aminoácidos da ligação Phe₁₀₅ e Met₁₀₆, produzindo o peptídeo para- κ -caseína que possui massa molecular aparente de 16 KDa (VISHWANATHA; APPU; SINGH, 2010; SHAH *et al.*, 2014). Portanto, ensaios foram realizados incubando a κ -caseína purificada com as peptidases de *C. procera* e

C. grandiflora por diferentes intervalos de tempo (Figura 19). A redução da intensidade da banda de κ -caseína por PLCp e PLCg foi acompanhada pelo aumento de intensidade da banda presente na região aproximada de 16 KDa, a qual, provavelmente, corresponde ao peptídeo para- κ -caseína. Um perfil eletroforético similar foi observado quando κ -caseína foi hidrolisada com a quimosina comercial (Coalhopar[®]). Adicionalmente, a hidrólise de κ -caseína por *C. procera* produziu vários peptídeos com massa molecular entre 20 e 16 KDa, o mesmo não foi observado quando a quimosina comercial e *C. grandiflora* foram testados (Figura 19).

Bruno e colaboradores (2010), utilizando um preparado enzimático a partir dos frutos de *Bromelia hieronymi*, observaram a presença de bandas proteicas, possivelmente a para- κ -caseína, na região de 16 KDa após 4 minutos a partir da hidrólise da κ -caseína. As peptidases das flores de *Moringa Oleifera* foram capazes de hidrolisar preferencialmente κ caseína acompanhado de um crescimento de intensidade na banda localizada na região de massa molecular aparente de 16 KDa após 10 minutos de incubação (PONTUAL *et al.*, 2012). As peptidases do látex de *Calotropis gigantea* foram capazes de hidrolisar 100% de κ -caseína após 1 hora de incubação, gerando o peptídeo para- κ -caseína na região de 16 KDa (ANUSHA *et al.*, 2014).

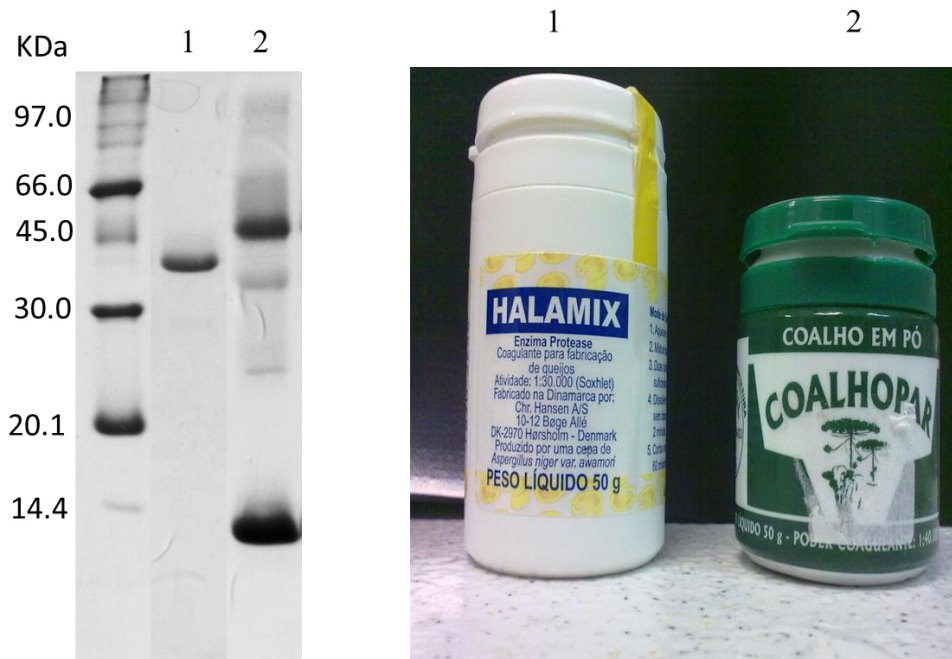
A fim de quantificar a hidrólise das caseínas pelas peptidases, os géis foram escaneados e a densitometria das bandas de caseína foram plotadas como percentual da caseína controle (tempo 0) (Figura 19). Os densitogramas revelaram que os coalhos comerciais, Coalhopar[®] e Halamix[®] hidrolisam, preferencialmente, a κ -caseína. Entretanto nota-se uma pequena digestão das α e β da caseínas (10,63 e 10,61%, respectivamente) por Halamix[®] após 30 minutos de reação. Coalhopar[®] é um extrato proteico obtido de bovinos, já Halamix[®] é uma preparação de peptidases de origem microbiana, produzida a partir de cepas do fungo *Aspergillus niger var. awamori*. A Figura 20 mostra que há diferença de perfil proteico entre esses coalhos. A quimosina bovina apresenta massa molecular aparente de 42,18 KDa, enquanto que a pepsina de origem bovina possui massa molecular aparente de aproximadamente 12,66 KDa. Anusha e colaboradores (2014) verificaram que o coalho bovino foi capaz de clivar 2,7% da subunidade α_1 , 68,75% de α_2 e 11,54% da subunidade β após 1 hora de incubação a 37 °C.

Figura 19 – SDS-PAGE 12,5% da hidrólise das caseínas do leite bovino por *C. procera* (A) e *C. grandiflora* (B) em diferentes intervalos de tempo. Em detalhe, a redução gradual das bandas de κ -caseína na região de 30 KDa e o aumento de para- κ -caseína, na região de 16 KDa.



Legenda: M: Marcador molecular: fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica bovina (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa). C: Coalhopar[®].

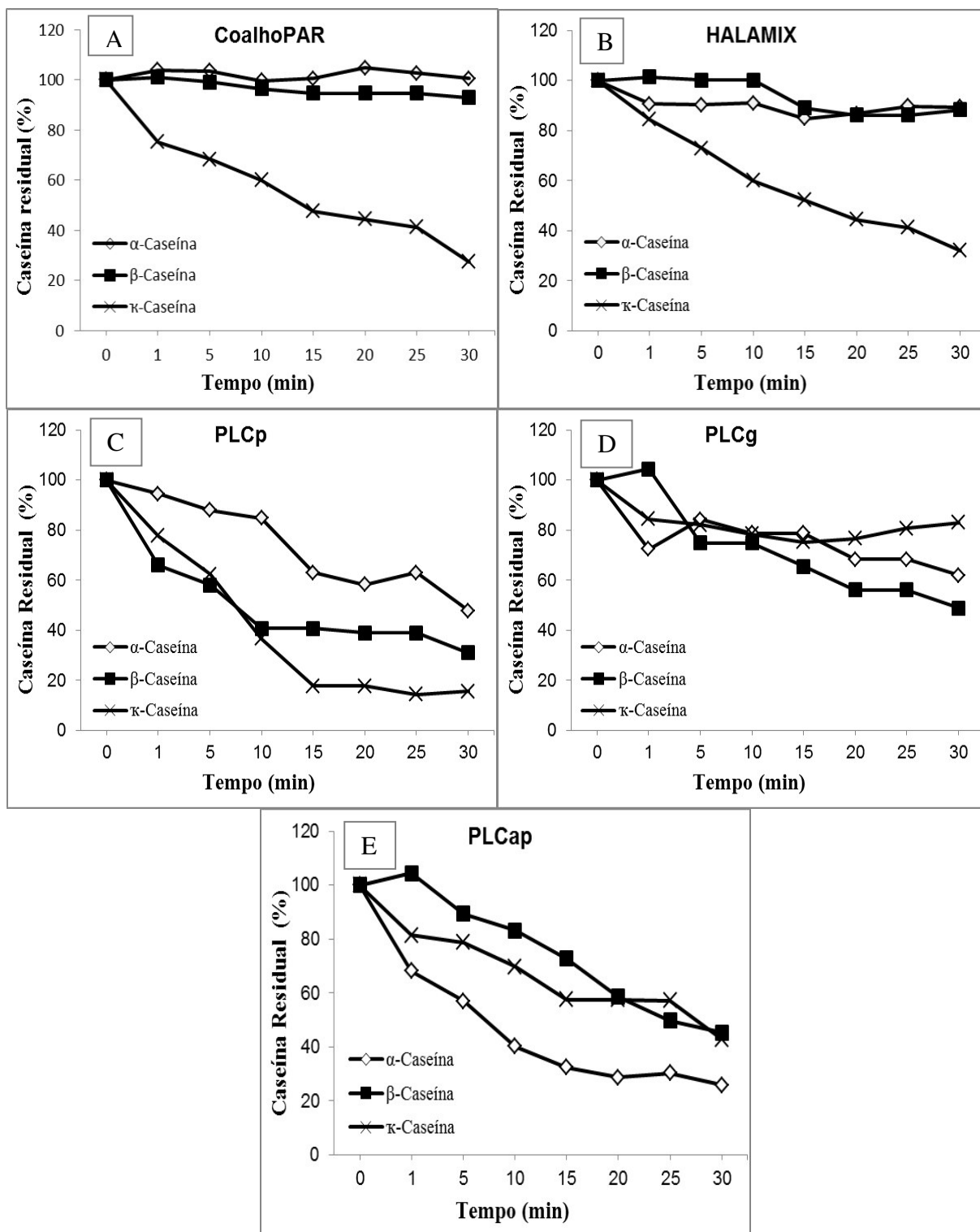
Figura 20 – SDS PAGE dos coalhos comerciais utilizados nos ensaios.



Legenda: 1 - Halamix[®], 2 - Coalhopar[®].

As peptidases de *C. procera* (PLCp) foram mais específicas para hidrolisar a subunidade κ da molécula de caseína em comparação com as peptidases de *C. grandiflora* (PLCg) e *C. papaya* (PLCap) (Figura 21). Após 30 minutos de reação, aproximadamente 85% da subunidade κ -caseína, 68% da subunidade β e 52% da subunidade α foram digeridas pelas peptidases de PLCp. As subunidades α (37,9%) e β (51%) foram mais susceptíveis a hidrólise por PLCg após 30 minutos de reação do que a fração κ (16,9%) da molécula de caseína. Resultados similares foram exibidos em peptidases extraídas de sementes de *S. dubium* e nas peptidases do fruto de *Bromelia hieronymi*, as quais foram capazes de hidrolisar as três subunidades da caseína, mas com uma maior especificidade à κ -caseína (AHMED *et al.*, 2010; BRUNO *et al.*, 2010).

Figura 21 – Degradação das caseínas pelas peptidases laticíferas. Valores correspondentes à densitometria das diferentes bandas da SDS-PAGE da Figura 18.



Fonte: Próprio autor

5.4 Espectrometria de massas

O espectro gerado após a análise por espectrometria de massas da fração κ -caseína digerida com as peptidases do coalho comercial Coalhopar[®] está demonstrado na Figura 22. Foi gerado, predominantemente, um peptídeo com massa de 8601,5000 Daltons. A hidrólise de κ -caseína é um passo crítico e inicial da formação da coalhada. É conhecido que a quimosina hidrolisa seletivamente a κ -caseína entre a ligação Phe₁₀₅–Met₁₀₆, gerando um peptídeo com massa de aproximadamente 12286,98 Da, chamado de para- κ -caseína, e outros com massa de aproximadamente 6675.47 Da, o glicomacropéptido (JACOB; JAROS; ROHM, 2011).

A relação quimosina/pepsina pode variar entre a espécie de ruminante, a raça e a idade do animal, de modo que essa relação diminui após o desmame (ANDRÉN, 2004). O coalho comercial Coalhopar[®] é um produto de origem animal constituído pela enzima quimosina, mas também por pepsina, cloreto de sódio e ácido bórico. De acordo com análises realizadas *in silico*, a pepsina (3.4.23.1) pode hidrolisar a κ -caseína em diferentes pontos, gerando peptídeos na faixa entre 1200 e 4000 Da, isso explicaria a diferença encontrada entre a clivagem teórica feita pela quimosina e a clivagem observada na Figura 22.

De acordo com o *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/>) a sequência de aminoácidos da molécula de κ -caseína de *Bos Taurus* é mostrada na Figura 23. Os peptídeos gerados pela hidrólise da fração κ -caseína são mostrados abaixo e o sítio de clivagem predominante para a amostra PLCp foi entre Q₇₂–I₇₃.

Figura 22 – Espectro de massas da banda de 16 kDa gerada a partir da hidrólise da κ -caseína com o coalho comercial Coalhopar[®].

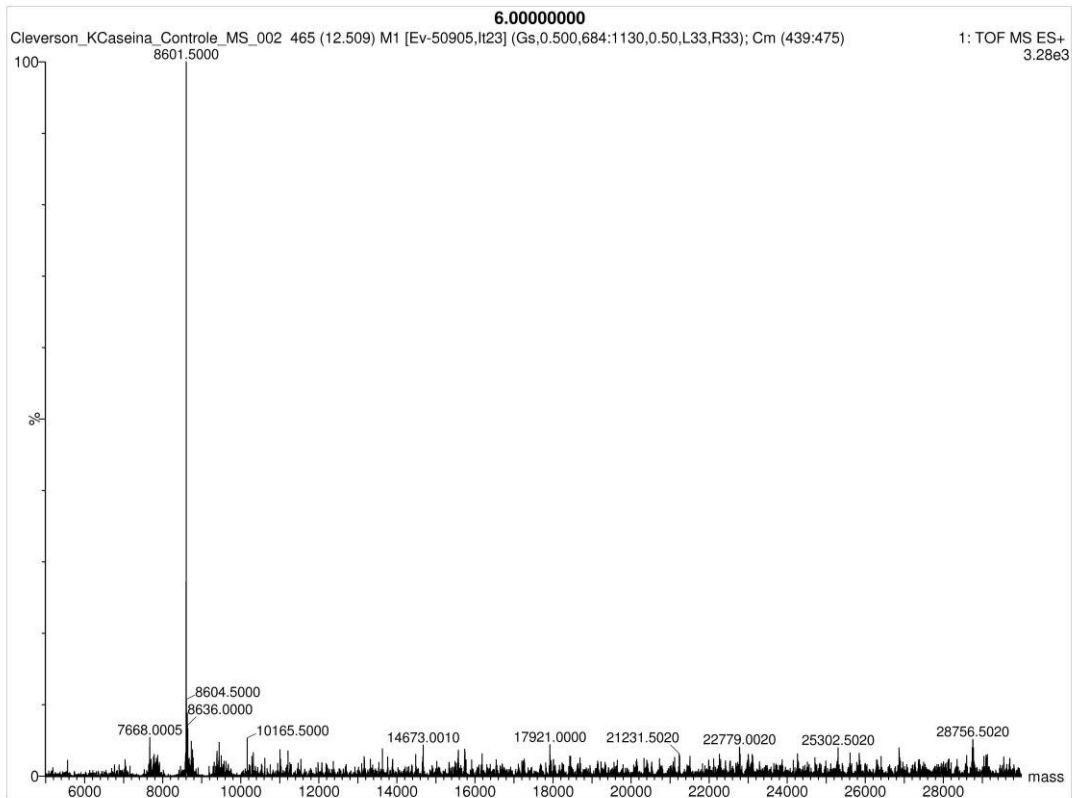


Figura 23 – Sequência de aminoácidos da molécula de κ -caseína (*Bos Taurus*)

10	20	30	40	50
MMKSFFLVVT	ILALTLPLFLG	AQEQNQEQPI	RCEKDERFFS	DKIAKYIPIQ
60	70	80	90	100
YVLSRYPSTG	LNYYQOKPVA	LINNQFLPYP	YYAKPAAVRS	PAQILQWQVL
110	120	130	140	150
SNTVPAKSCQ	AQPTTMRHP	HPHLSFMAIP	PKKNQDKTEI	PTINTIASGE
160	170	180	190	
PTSTPTTEAV	ESTVATLEDS	PEVIESPPEI	NTVQVTSTAV	

GenBank: AAQ87923.1 gi36988716|gb|AAQ87923.1| kappa casein [Bos taurus]

Legenda: a sequência grifada em vermelho representa o peptídeo sinal, em azul a p-caseína, em amarelo o glicomacropéptido teórico, em negrito o possível peptídeo gerado pela hidrólise com Coalhopar[®], em itálico (899.10 Da) e sublinhado (2845.20 Da) os peptídeos gerados pela possível hidrólise por pepsina.

Hang e colaboradores (2016) mostraram que uma metalopeptidase obtida do fungo *Paenibacillus spp.*; além de possuir atividade coagulante foi capaz de gerar 9 peptídeos após a

hidrólise da fração κ -caseína, com massa variando entre 1131.6167 e 4394.2116 Da. PLCp (Figura 24) e PLCg (Figura 25) geraram cada uma, um peptídeo de massa 8602,0000 com maior intensidade. Os resultados sugerem que essas amostras possivelmente tem como sítio de clivagem principal a ligação $Q_{72}-I_{73}$ (Figura 24 e 25), porém também clivam, de maneira mais extensa, a molécula de κ -caseína gerando outros peptídeos. O sabor amargo em alguns queijos pode se dever a presença de peptídeos de baixa massa molecular, que não foram degradados a peptídeos com gosto menos amargo e aminoácidos (ADDA; GRIPON; VASSAL, 1982).

Figura 24 – Espectro de massas nativo deconvoluído da fração κ -caseína digerida com PLCp após 1 hora de reação, obtido por ESI-TOF.

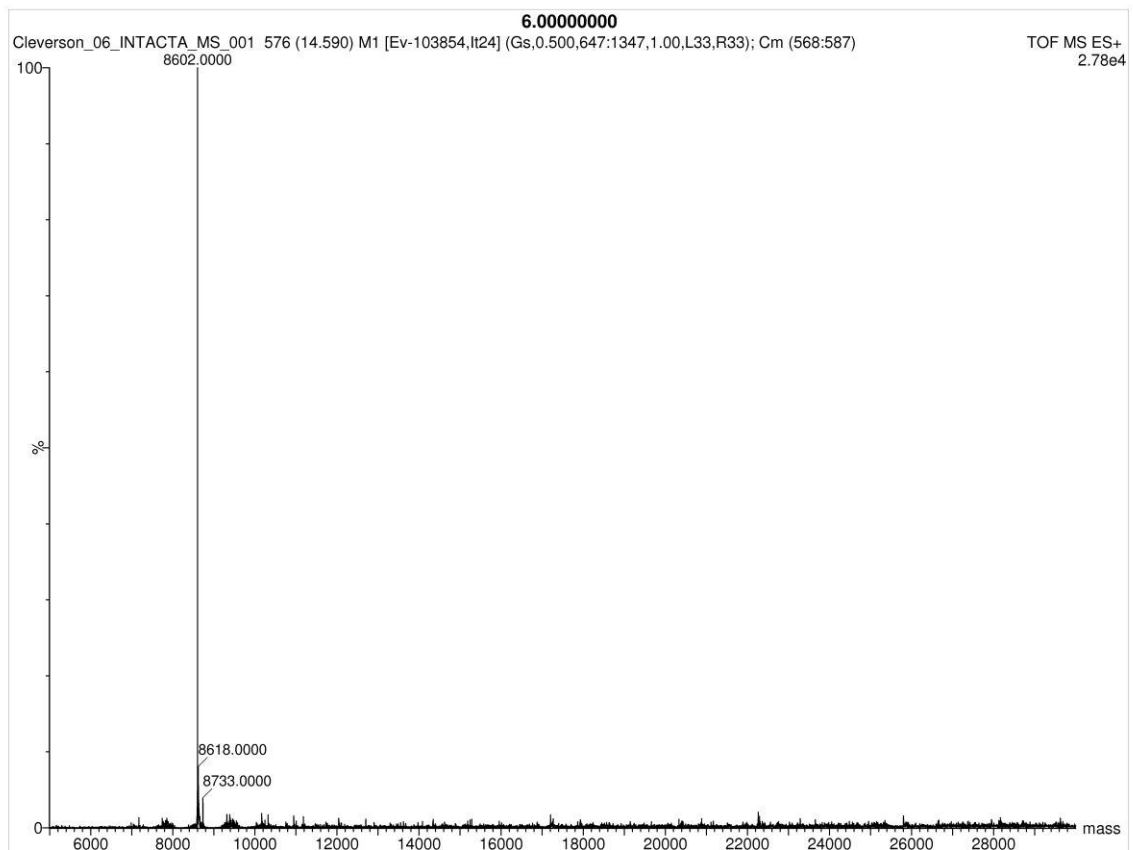
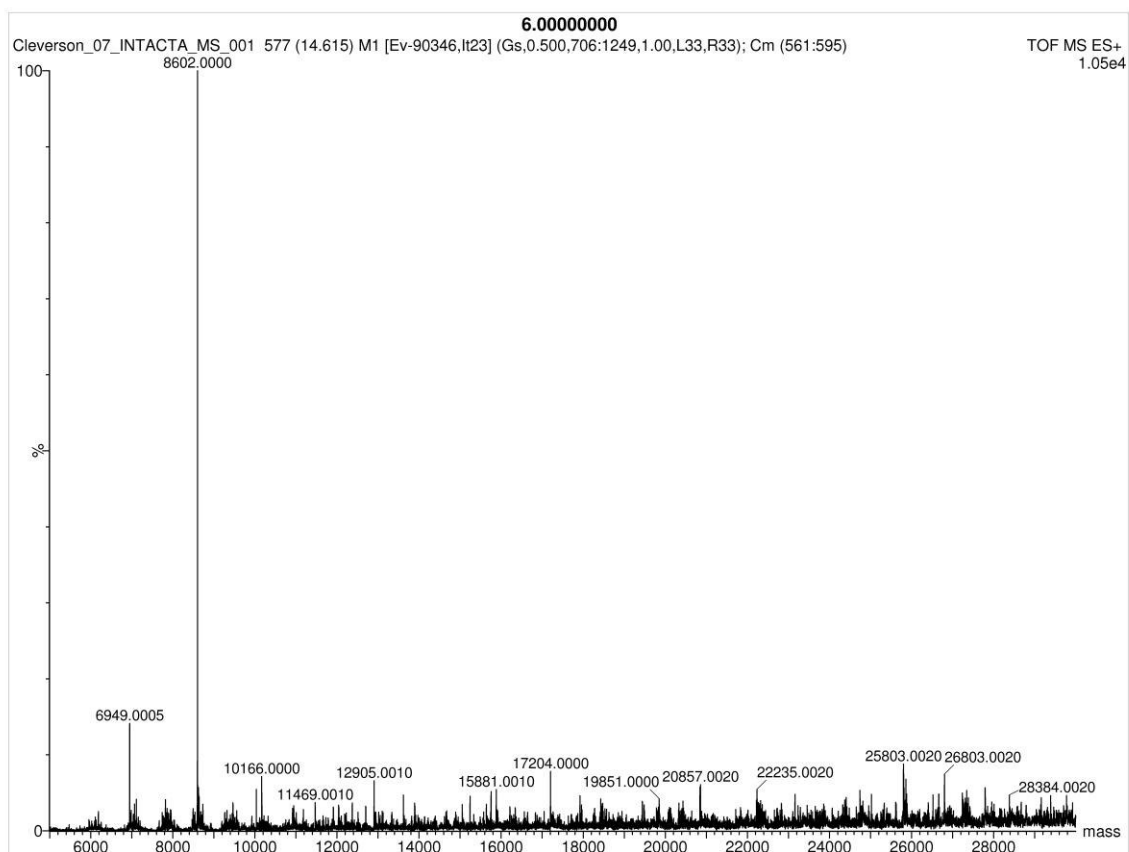


Figura 25 – Espectro de massas nativo deconvolvido da fração κ -caseína digerida com PLCg após 1 hora de reação, obtido por ESI-TOF.



5.5 Manufatura do queijo e caracterização parcial

Os queijos obtidos pelas peptidases laticíferas estão mostrados na Figura 26. Algumas características dos queijos feitos com o coalho comercial e as peptidases de *C. procera* e *C. grandiflora* são apresentadas na Tabela 2. A massa fresca dos queijos produzidos com coalho comercial correspondeu, em média, a 52,1 gramas. Os queijos obtidos por PLCp com 9, 10 e 11 mg e os obtidos por PLCg com 40 mg não foram diferentes estatisticamente do queijo controle (Coalhopar[®]). Os melhores resultados de tempo de coagulação utilizando 500 mL de leite foram obtidos com 9 e 40 miligramas de proteína de PLCp e PLCg, respectivamente. A massa fresca de queijos gerados a partir das peptidases do látex de *Euphorbia tirucalli*, *E. nivulia* e *E. nerifolia* foi de 43,20; 45,30 e 45,09 gramas, respectivamente, a partir de 300 mL de leite (MAHAJAN; CHAUDHARI, 2014).

A quantificação de proteínas solúveis dos queijos liofilizados não revelou diferenças significativas entre os queijos controle e das amostras PLCp e PLCg. O valor médio do teor de proteínas solúveis dos queijos obtidos com as peptidases de *C. procera* 9, 10 e 11 mg foi respectivamente 14,7; 15,7 e 11,7 mg/g de queijo, de *C. grandiflora* a partir de 40 e 50 mg foi de 14 e 12,4 mg/g de queijo, respectivamente e 11,1 mg/g de queijo para o coalho comercial. Resultados similares foram observados com as peptidases do látex de *Euphorbia tirucalli*, *E. nivulia* e *E. nerifolia* (14,66; 15,29 e 12,44; respectivamente) (MAHAJAN; CHAUDHARI, 2014). Uaboi-Egbenni e colaboradores (2010) utilizando o extrato das folhas de *C. procera* obteve um teor de 12,8 mg de proteína em 1 grama de queijo. Durante a maturação, parte da porção hidrofóbica da caseína é convertida em compostos nitrogenados solúveis incluindo aminoácidos livres e produtos da hidrólise proteica, adicionalmente, o conteúdo de proteína decresce durante essa etapa. Dessa forma, uma peptidase altamente ativa durante a maturação diminuiria o teor de proteína presente no queijo, podendo também gerar peptídeos que gerem sabor amargo ao produto final (BARAC *et al.*, 2013).

Entre as amostras testadas, o tempo mínimo e máximo de coagulação variou entre 4 e 18 minutos a 25 °C, sendo que os menores tempos de coagulação foram vistos quando aplicada uma maior concentração de peptidases tanto em *C. procera* (10' 53'') como em *C. grandiflora* (4'). O rendimento dos queijos foi de aproximadamente 12% a partir de 500 mL de leite integral, valores similares (14 %, aproximadamente) foram obtidos com coalho obtido a partir das folhas de *C. procera* (AWORH; MULLER, 1987). De modo semelhante, porém com extratos dos frutos de *Bromelia hieronymi*, um rendimento de aproximadamente 15% foi

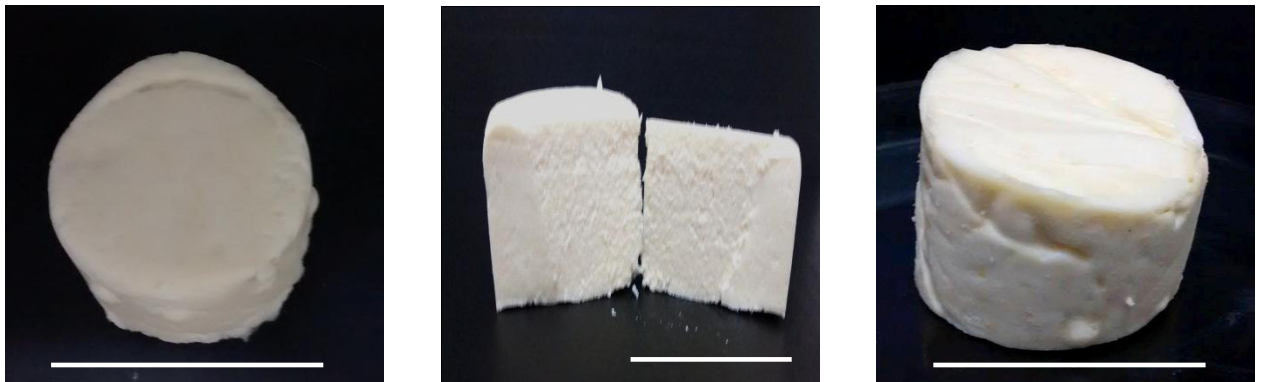
obtido (BRUNO *et al.*, 2010). Os valores de rendimento, massa seca, proteínas solúveis e da aparência (superfície e formato) dos queijos produzidos com as peptidases dos látex foram similares aos preparados com a quimosina comercial (Tabela 2 e Figura 26). Um ensaio preliminar mostrou que os queijos apresentavam sabor, textura e aroma agradáveis.

Figura 26 – Imagem dos queijos produzidos por PLCp e PLCg.

Calotropis procera (PLCp)



Cryptostegia grandiflora (PLCg)



Fonte: próprio autor.

Tabela 2. Características dos queijos manufacturados com as peptidases de *Calotropis procera* e *Cryptostegia grandiflora* em comparação a quimosina comercial (Coalhopar®)

Coagulante	Amostra (mg)/500 mL leite	Massa fresca (g)	Massa seca* (g)	Proteínas solúveis** (mg)/g queijo	Tempo de coagulação do leite
<i>C. procera</i>	9	59.3 ± 2.2 ^a	27.7 ± 1.8 ^a	14.7 ± 2.9 ^a	17'05'' ± 2' ^a
	10	64.7 ± 5.6 ^a	25.2 ± 5.9 ^a	15.7 ± 2.3 ^a	18'56'' ± 5' ^a
	11	59.1 ± 1.1 ^a	24.4 ± 3.7 ^a	11.7 ± 3.6 ^a	10'53'' ± 2' ^a
<i>C. grandiflora</i>	30	-	-	-	-
	40	53.3 ± 2.8 ^a	29.2 ± 1.7 ^a	14.0 ± 3.0 ^a	7'18'' ± 30'' ^a
	50	51.8 ± 4.3 ^b	27.8 ± 2.6 ^a	12.4 ± 7.6 ^a	4'00'' ± 50'' ^a
Coalhopar®	10	52.1 ± 2.5 ^a	28.0 ± 1.1 ^a	11.1 ± 5.1 ^a	16'24'' ± 40'' ^a

* Os queijos frescos foram liofilizados e a massa seca determinada.

** Proteínas solúveis foram extraídas em tampão 50 mM Tris-HCl 50 mM (pH 6.5) e determinada pelo método de Bradford (1976).

Uma mesma letra, na mesma coluna, indica diferença não significativa $p < 0.05$, quando comparada com Coalhopar®.

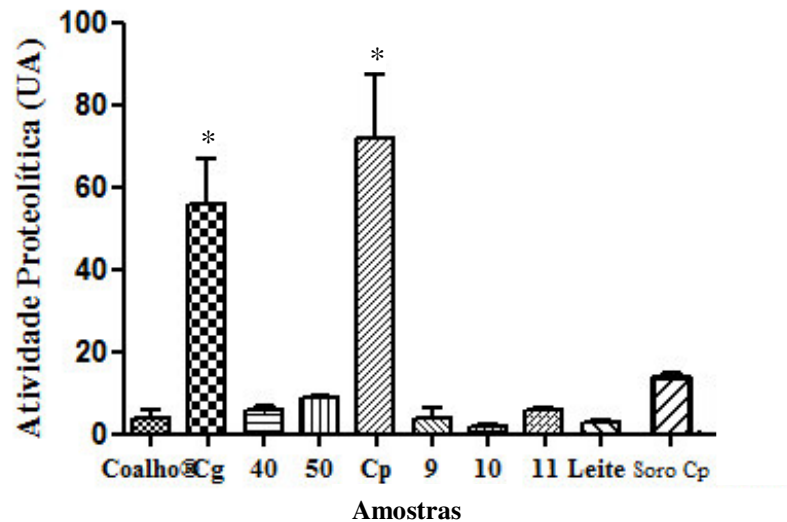
A proteólise é conhecida como um dos principais eventos bioquímicos para o estabelecimento do sabor e odor de queijos durante a fase de maturação e armazenamento (GARCIA *et al.*, 2012). Os queijos produzidos com as peptidases laticíferas não apresentaram atividade proteolítica residual, de maneira similar, os queijos produzidos com o coalho comercial também não demonstraram capacidade de hidrolisar o substrato inespecífico, azocaseína e nem gelatina (Figura 27 e 28). Esse resultado é importante, já que demonstra que haverá uma baixíssima hidrólise das caseínas durante a etapa de maturação, evitando possíveis mudanças na textura, sabor e aroma do produto. Esses resultados corroboram com os dados da Figura 17, onde as peptidases de *C. procera* e *C. grandiflora* foram inativadas depois de aquecimento a 75 °C durante 10 minutos. Durante a manufatura do queijo coalho, um dos procedimentos consiste em aquecer o soro a 80 °C para cozinhar a coalhada. Então, durante esse passo, é possível que as peptidases do látex sejam inativadas. Llorente *et al.*, 2014 demonstraram que o extrato proteolítico das flores de *Cynara scolymus* foi capaz de coagular o leite e produzir queijos com qualidade similar ao alcançado com a quimosina. Entretanto, eles demonstraram que a fração proteolítica permanecia ativa mesmo durante a maturação, acarretando em sabor amargo. Portanto, a atividade proteolítica residual pode ser considerada como a principal desvantagem de peptidases vegetais muito ativas.

Proteínas residuais do látex de *C. procera* e *C. grandiflora* não foram detectadas através do ensaio de ELISA nos queijos produzidos com essas peptidases (Figura 29). Esse resultado pode ser explicado já que durante a manufatura dos queijos, a coalhada é prensada por 12 horas para drenar a maior parte do soro. Nessa etapa, as proteínas do látex podem ser totalmente eliminadas junto com outras proteínas solúveis presentes no soro. Assim, esse resultado é um indício que uma reação alérgica ou tóxica ao queijo produzido com essas frações do látex pode ser baixa.

Outros trabalhos já evidenciaram o uso potencial de folhas de *C. procera* na manufatura de queijos (AWORTH; MULLER, 1987; ADETUNJI; SALAWU, 2008). Nesses estudos, foi utilizado um extrato total produzido a partir das folhas. Segundo Konno (2011), o uso desses extratos é limitado em virtude de os fluidos laticíferos serem fontes ricas de metabólitos secundários, alguns deles tóxicos. Consequentemente, a qualidade, o sabor e a segurança alimentar do queijo pode ser complicada de se avaliar. No presente trabalho, uma fração purificada do látex foi utilizada, a qual é rica em enzimas proteolíticas e livre de metabólitos secundários e moléculas de baixa massa molecular (Freitas *et al.*, 2007).

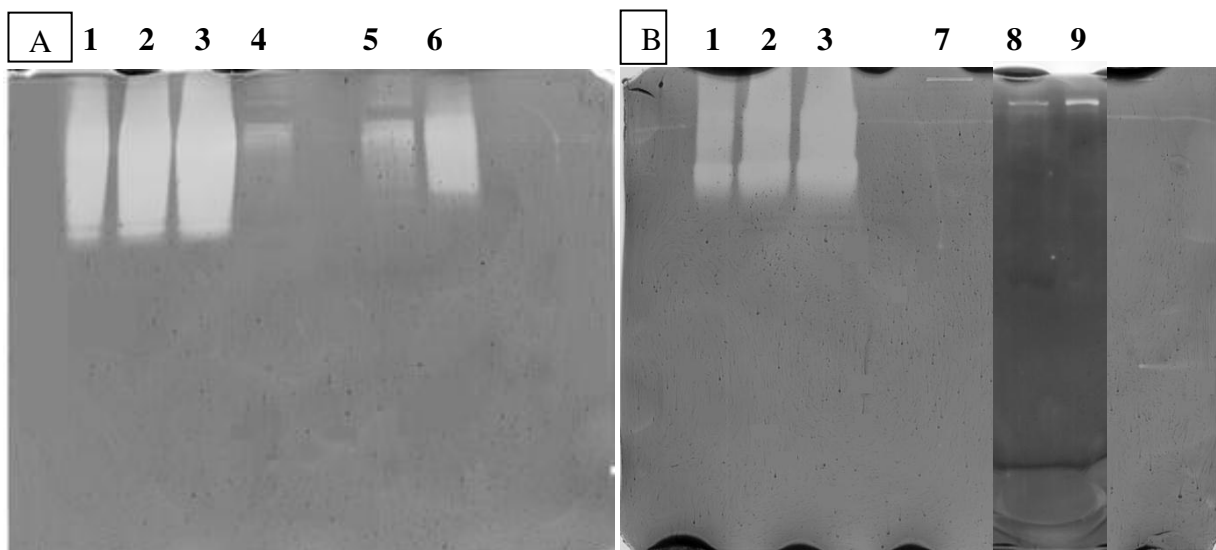
Figura 27 – Atividade proteolítica dos queijos produzidos com as peptidases de *C. procera* e *C. grandiflora*, comparada com o controle.

Atividade proteolítica dos queijos liofilizados



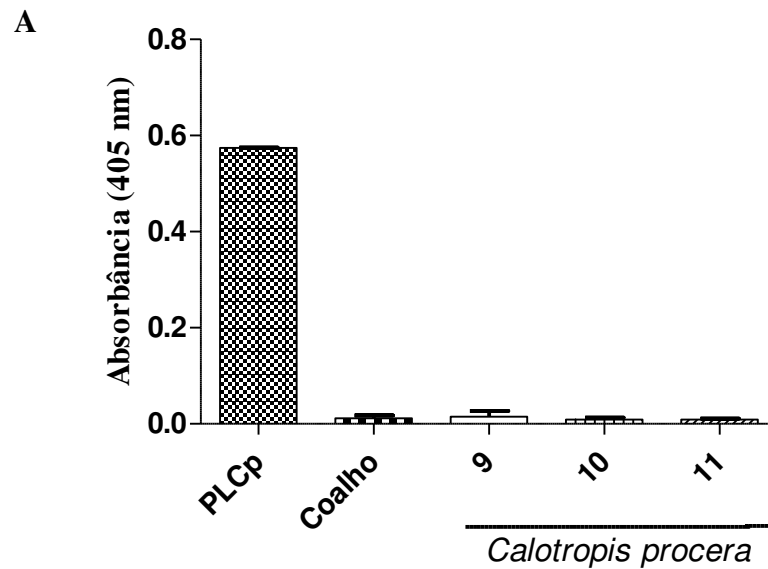
Legenda: Coalho: Coalhopar®, Cp: Proteínas do látex de *C. procera*, Cg: Proteínas do latex de *C. grandiflora*, Leite: Leite fresco na ausência de ativador L-cisteína, Soro: soro obtido após a coagulação do leite. (*) indica $p < 0,05$ e diferença estatística quando comparado aos outros grupos ($n=3$, ANOVA teste Student Newman-Keuls).

Figura 28 – Zimograma em gel de poliacrilamida contendo 0,1% de gelatina dos extratos dos queijos produzidos com as peptidases de *C. procera* e *C. grandiflora*. Amostras foram extraídas a partir dos queijos liofilizados.

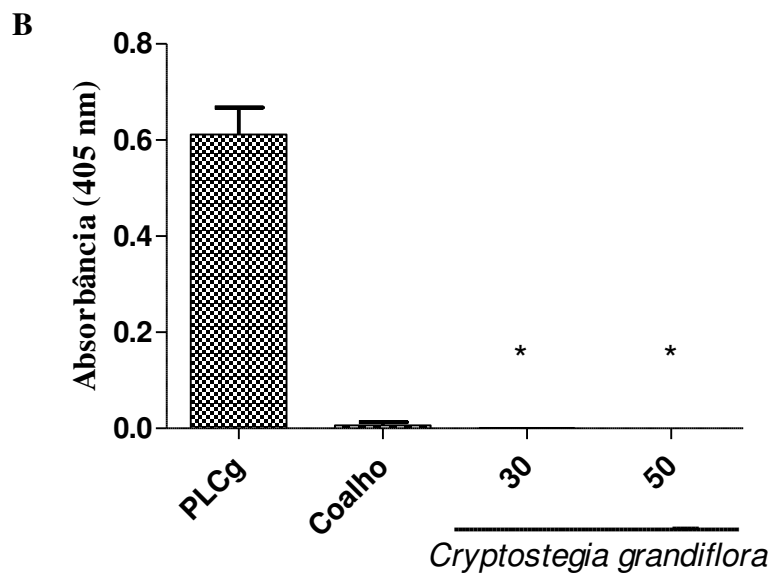


Legenda: PLCp e PLCg 0,1 mg/mL. Raia 1: 10 μ L, 2: 20 μ L, 3: 30 μ L de PLCg (A) ou de PLCp (B). 4: Coalho comercial, 5: queijo com 40 mg de PLCg, 6: queijo com 50 mg de PLCg., 7: queijo com 9 mg de PLCp, 8: queijo com 10 mg de PLCp e 9: queijo com 11 mg de PLCp.

Figura 29 – Imunodeteção (ELISA) de proteínas do látex de *C. procera* (PLCp) e *C. grandiflora* (PLCg) nos queijos produzidos por peptidases destas plantas, utilizando anticorpos policlonais anti-PLCp (A) e anti-PLCg (B).



Legenda: PLCp 0,1 mg/mL, Coalho: Coalhopar[®], queijos produzidos com 9, 10 e 11 mg de PLCp. Anticorpo primário 1:10000 e anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina 1:5000.



Legenda: PLCg 0,1 mg/mL, C: Coalhopar[®], queijos produzidos com 30 e 50 mg de PLCg. Anticorpo primário 1:10000 e anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina 1:5000. * indica que não houve detecção.

4 CONCLUSÃO

O estudo de cinco frações laticíferas para coagulação do leite revelou que somente as peptidases de *C. procera* e *C. grandiflora* demonstraram potencial como alternativa para o uso da quimosina comercial animal. L-cisteína promoveu a ativação das peptidases das proteínas laticíferas de maneira similar ao agente redutor DTT. As frações proteolíticas de *C. procera* e *C. grandiflora* foram inativadas depois de aquecidas a 75 °C. Os queijos que foram obtidos com as peptidases de *C. procera* e *C. grandiflora* apresentaram uma boa aparência, textura, aroma e sabor agradável e não apresentaram atividade proteolítica residual ou proteínas laticíferas.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL A. A.; KONNO K. Latex: A Model for Understanding Mechanisms, Ecology, and Evolution of Plant Defense Against Herbivory. **The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. Volume 40, p. 11–31. 2009.
- ADDA, J.; GRIPON, J. C.; VASSAL, L. The chemistry of flavor and texture generation in cheese. **Food Chemistry**. Volume, 9, p. 115-129, 1982.
- AHMED, I. A. M; BABIKER, E.E. pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds and its enzymatic action on bovine caseins. **LWT Food Sci Technol**. Volume 43, p.759-764. 2010.
- ALBUQUERQUE, T. M.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, J. G.; Vascular permeability, neutrophil migration and edematogenic effects induced by the latex of *Cryptostegia grandiflora*. **Toxicon**. Volume 53, p. 15–23, 2009.
- ALMEIDA, S. L.; JÚNIOR F. G. P.; GUERRA, J. R. F. Representação da Produção e Consumo do Queijo Coalho Artesanal. RIGS, **Revista interdisciplinar de gestão social**. Volume 2, n.2. 2013.
- AMARANTE, J. **Queijos do Brasil e do Mundo - Para Iniciantes e Apreciadores**. 1ª edição. Mescla Editorial. 352 páginas. 2015.
- AMARO, M. S.; MEDEIROS FILHO, S.; GUIMARAES, R. M. TEOFILO, E. M. Influência da temperatura e regime de luz na germinação de sementes de janaguba (*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel.). **Ciência agrotecnica**. Volume 30, n.3, pp.450-457. 2006.
- ADETUNJI, V. O.; SALAWU, O. T. West African soft cheese ‘wara’ processed with *Calotropis procera* and *Carica Papaya*: A comparative assessment of nutritional values. **African Journal Biotechnology**, Volume 7, p. 3360-3362. 2008.
- ANDRÉN, A. Rennets and coagulants. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, p. 281-286, 2004.
- ANUSHA R.; SINGH, M. K.; BINDHU O. S. Characterisation of potential milk coagulants from *Calotropis gigantean* plant parts and their hydrolytic pattern of bovine casein. **Eur Food Res Technol**. Volume 238, p. 997-1006. 2014.
- ARAÚJO, J. B. C. PIMENTEL, J. C. M; NETO, A. G. V.; MATTOS, A. L. A.; PESSOA P. F. Adoção de tecnologia para melhoria do processo de produção de queijo de coalho artesanal de agricultores familiares dos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte. **XXXI ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO**. 2011.
- ARAYA-GARAY J. M.; FEIJOO-SIOTA L.; VEIGA-CRESPO P.; VILLA T. G. cDNA cloning of a novel gene codifying for the enzyme lycopene β -cyclase from *Ficus carica* and its expression in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology Biotechnology**. Volume 92(4), p. 769–777. 2011.

ARIMA K.; UCHIKOBA T.; YONEZAWA H.; SHIMADA M.; KANEDA M. Cucumisin-like protease from the latex of *Euphorbia supina*. **Phytochemistry**. Volume 53(6), p. 639–644. 2000.

AMRI E.; MAMBOYA F. Papain, a plant enzyme of biological importance: A Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, volume 8 (2), p. 99-104 2012.

AWORH, O.; MULLER, H. G. Cheese-making properties of vegetable rennet from Sodom apple (*Calotropis procera*). **Food Chemistry**. Volume 26, p. 71-79. 1987.

AZARKAN, M., EL MOUSSAOUI, A., van WUYTSWINKEL, D., DEHON, G., LOOZE, Y. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. **Journal of chromatography B**. Volume 790, p. 229-238. 2003.

BARAĆ, M. B.; SMILJANIĆ, M., PEŠIĆ, M. B., STANOJEVIĆ, S. P.; JOVANOVIĆ S. T.; MAČEJ, O. D. Primary proteolysis of white brined goat cheese monitored by high molarity Tris buffer SDS- PAGE system. **Mljekarstvo**. Volume 63 (3), p. 122-131. (2013).

BASTOS, C. L.; KELLER, Vicente. **Aprendendo a aprender**: introdução à metodologia científica. 19. ed. Petrópolis: Vozes, 2006.

BEKA, T. G.; KRIER, F., BOTQUIN, M.; VALENTIN, D.,; CARL M. M., DIMITROV, K.; SLOMIANNY, M. C.; GUILLOCHON, D.; VERCAIGNE-MARKO, D. Characterisation of a milk-clotting extract from *Balanites aegyptiaca* fruit pulp. **International Dairy Journal**. Volume 34, p. 25-31. 2014.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. Volume 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Brasília, DF. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011, Diário Oficial da União, Brasília, 29 de dezembro de 2011**, seção 1, página 6. Disponível em: <http://www.jusbrasil.com.br>

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Projeto de Melhoria da Competitividade do Setor Lácteo Brasileiro**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2015.

BRUNO, M. A.; LAZZA, C. M.; ERRASTI, M. E.; LOPEZ, L. M. I.; CAFFINI, N. O.; PARDO, M. F. Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. **LWT Food Sci Technol**. Volume 43, p. 695-701. 2010.

BRUTTI, C. B.; PARDO M. F.; CAFFINI, N. O.; NATALUCCI, C. L. *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. **LWT Food Sci Technol**. Volume 45, p. 172-179. 2012.

CAVALHEIRO, M. G. **Caracterização Bioquímica parcial do látex de *Cryptostegia grandiflora* r. Br. e ação contra o vetor da dengue.** Dissertação (mestrado) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

CHOI, J.; HAN, S.; KIM, H. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**. Volume 33, p. 1443-1454. 2015.

CHOUDHURY D.; ROY S.; CHAKRABARTI C.; BISWAS S.; DATTA GUPTA J.K. Production and recovery of recombinant propapain with high yield. **Phytochemistry**. Volume 70, p. 465-472. 2009.

COLARES, A.V.; CORDEIRO, L.N.; COSTA J.; SILVEIRA E.R.; CAMPOS A.R.; CARDOSO A.H., Phytochemical and biological preliminary study of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Janaguba). **Pharmacognosy Magazine**. Volume 4, p. 73-77. 2008.

CORNISH-BOWDEN A. Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics. **Perspectives in Science**. Volume 1, p. 74–87. 2014.

CORRONS, M. A.; BERTUCCI, J. I.; LIGGIERI, C. S.; LÓPEZ, L. M. I.; BRUNO, M. A. Milk clotting activity and production of bioactive peptides from whey using *Maclura pomifera* proteases. **LWT – Food Science and Technology**. Volume 47, p. 103-109, 2012.

COSTA T. F. R.; LIMA A. P. C. A. Natural cysteine protease inhibitors in protozoa: Fifteen years of the chagasin family. **Biochimie**. Volume 122, p. 197-207. 2016.

COUTINHO, M. J. F.; CARNEIRO M. S. S.; LOIOLA R. E.; PINTO, A. P. A PECUÁRIA COMO ATIVIDADE ESTABILIZADORA NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO. **Veterinária e Zootecnia**. Volume 2, p. 9-17. 2013.

DE PAULA, J.; CARVALHO, M.; FURTADO M.; PRINCÍPIOS BÁSICOS DE FABRICAÇÃO DE QUEIJO: DO HISTÓRICO À SALGA. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, nº 367/368, 64, p. 19-25, 2009.

DIAS, J. A.; ANTES, F. G. Qualidade físico-química, higiênico-sanitária e composicional do leite cru: indicadores e aplicações práticas. **Instrução Normativa 62**. Embrapa Rondônia, p. 1-19. 2014.

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

DREW R. **Micropropagation of Carica Papaya and Related Species**. Springer Netherlands, volume 75, p. 543-564. 2003.

EGITO, A.S.; GIRARDET, J.M.; LAGUNA, L.E.; POIRSON, C.; MOLLE, D.; MICLO, L.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. Milk clotting activity of enzyme extracts from sunflower and *albizia seeds* and specific hydrolysis of bovine K-casein. **International Dairy Journal**. Volume 17, p. 816-825. 2007.

FACCIA M.; PICARIELLO G.; TRANI A.; LOIZZO P.; GAMBACORTA G.; LAMACCHIA C.; DI LUCCIA A. Proteolysis of Caciocotta cheese made from goat milk coagulated with caprifig (*Ficus carica sylvestris*) or calf rennet. **Euro Food Reserch Technology**, volume 234, p. 527–533. 2012.

FAMELART, M. H.; LE GRAET, Y.; RAULOT, K. Casein micelle dispersions into water, NaCl and CaCl₂: physicochemical characteristics of micelles and rennet coagulation. **International Dairy Journal**. Volume 9, p. 293-297. 1999.

FRACASSO, R.; PFÜLLER E. E. PROCESSAMENTO DO LEITE PARA A FABRICAÇÃO DO QUEIJO NA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS CAMOZZATO LTDA, SANANDUVA – RS. **RAMVI, Getúlio Vargas**. Volume 01, n. 02. 2014.

FREITAS, C. D. T.; ARAÚJO, E. S.; OLIVEIRA, R. S. B.; TEIXEIRA, F. M.; PEREIRA, D. A., CAVALHEIRO, M. G., SOUZA, D. P., OLIVEIRA, J. S.; RAMOS, M. V. Latex fluids are endowed with insect repellent activity not specifically related to their proteins or volatile substances. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, volume 23, nº 1, p. 57-66, 2011.

FREITAS, C.D.T., OLIVEIRA, J.S., MIRANDA, M.R.A., MACEDO, N.M.R., SALES, M.P., VILLAS-BOAS, L.A., RAMOS, M.V. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, volume 45, p. 781-789. 2007.

FREITAS, C.D.T., SILVA, M.Z.R., BRUNO-MORENO, F., MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O., MOREIRA, R.A., & RAMOS, M.V. New constitutive latex osmotin-like proteins lacking antifungal activity. **Plant Physiology and Biochemistry**. Volume 96, p. 45-52. 2015.

FREITAS, C.D.T.; SOUZA, D.P.; ARAUJO, E.S.; CAVALHEIRO, M.G.; OLIVEIRA, L.S.; RAMOS, M.V. Anti-oxidative and proteolytic activities and protein profile of laticifer cells of *Cryptostegia grandiflora*, *Plumeria rubra* and *Euphorbia tirucalli*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. Volume 22, n. 1, p.11-22, 2010.

GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, M. E.; QUEIROGA, R. C.; MACHADO, T. A.; SOUZA, E. L. Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. Volume 63(8), p. 947-956. 2012.

GARCÍA, V.; ROVIRA, S.; BOUTOIAL, K.; ÁLVAREZ, D.; LÓPEZ, M. B. A comparison of the use of thistle (*Cynara cardunculus* L.) and artichoke (*Cynara scolymus* L.) aqueous extracts for milk coagulation. **Dairy Sci. & Technol**. Volume 95. P. 197-208. 2015.

GINGERA, M. R.; GRIGOR M. R. Comparative aspects of milk caseins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. Volume 64, p. 133-145. 1999.

GROTEN, K.; DUTILLEUL, C.; PHILIPPUS D. R.; VAN HEERDEN; BERNARD, S.; IRIS F.; KARL-JOSEF, D.; CHRISTINE, H. F. Redox regulation of peroxiredoxin and proteinases by ascorbate and thiols during pea root nodule senescence. **FEBS Letters**. Volume 580, p. 1269–1276. 2006.

GROZDANOVIC, M. M., BURAZER, L.; GAVROVIC-JANKULOVIC, M. Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) extract shows potential as a low-cost and efficient milk-clotting agent. **International Dairy Journal**. Volume 32, p. 46-52. 2013.

GONÇALVES, C. A. A.; JERÔNIMO, M.; AUGUSTA, I.; MATTOS, F.; CIABOTTI, S.; SILVA, M. B. S. EFEITO DO USO DE CLORETO DE CÁLCIO NOS ASPECTOS SENSORIAIS DO QUEIJO MINAS FRESCAL. **Centro Científico Conhecer – Goiânia**. Volume 6, n.10, p.1-4. 2010.

GONZÁLEZ-RÁBADE, N., BADILLO-CORONA, J.A., ARANDA-BARRADAS, J.S.; OLIVER-SALVADOR, M.C. Production of plant proteases in vivo and in vitro - A review. **Biotechnology Advances**, volume 29, p. 983–996. 2011.

GUIAMA, V. D.; LIBOUGA, D. G; NGAH, E.; BEKA, R. G.; MALOGA, B; BINDZI, J.M.; DONN, P.; MBOFUNG, C.M. Milk-clotting potential of fruit extracts from *Solanum esculentum*, *Solanum macrocarpon* and *Solanum melongena*. **African Journal of Biohecnology**. Volume 9, p. 1797-1802. 2010 a.

GUIAMA, V. D. D. G. LIBOUGA; NGAH, E.; MBOFUNG C. M. Milk-clotting activity of berries extracts from nine *Solanum* plants. **African Journal of Biotechnology**. Volume 9(25), p. 3911-3918. 2010 b.

GUINEE, T.P.; FOX, P.F. **Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects**. In P.F. Fox (Ed.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (3rded.). General aspects, Vol 1. London, UK: Chapman and Hall. 2004.

HANG, F. H.; WANG, Q.; HONG, Q. LIU, P. WUB, Z.; LIU, Z.; ZHANG, H.; CHEN, W. Purification and characterization of a novel milk-clotting metalloproteinase from *Paenibacillus* spp. BD3526. **International Journal of Biological Macromolecules**. Volume 85, p. 547-554. 2016.

HASHIM, M. M.; MINGSHENG, D.; IQBAL, M. F.; XIAOHONG, C. Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. **Phytochemistry**. Volume 72, p. 458–464. 2011.

HEAD L.; ATCHISON J.; PHILLIPS C. The distinctive capacities of plants: re-thinking difference via invasive species. **Transactions of the Institute of British Geographers**. Volume 40, p. 399-413. 2015.

HOLT, C.; CARVER, J.; ECROYD H.; THORN D. C. Invited review: Caseins and the casein micelle: their biological functions, structures, and behavior in foods. **Journal of Dairy Science**. Volume 96, n. 10, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, volume 42, p. 1-39. 2014.

JACOB, M.; JAROS D.; ROHM, H. Recent advances in milk clotting enzymes. **Int J Dairy Technol**. Volume 64, p. 14–33. 2011.

JEEWANTHI, R.; LEE N.; PAIK H. Improved Functional Characteristics of Whey Protein Hydrolysates in Food Industry. *Korean J. Food Sci. An.* Volume 35, número 3, p. 350-359. 2015.

JOLLE`S, P.; ALAIS, C., JOLLE`S, J. Study of k-casein form cows. Characterization of the linkage sensitive to the action of rennin. *Biochimica et Biophysica Acta*. Volume 69, p. 511-517. 1963.

KARDONO L. B.; TSAURI S.; PADMAWINATA K.; PEZZUTO J. M.; KINGHORN A. D. Cytotoxic constituents of the bark of *Plumeria rubra* collected in Indonesia. *Journal of Natural Products*. Volume 53(6), p. Dec1447–1455. 1990.

KHAN A. R.; JAMES M. N. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. Volume 7 p. 815-836. 1998.

KAWASAKI, LAFONT, K.A.; SIRE, J.Y. The Evolution of Milk Casein Genes from Tooth Genes before the Origin of Mammals. *Molecular Biology and Evolution*. Volume 28 (7), p. 2053-2061. 2011.

KETHIREDDIPALLI, P.; HILL, A. R. Rennet Coagulation and Cheesemaking Properties of Thermally Processed Milk: Overview and Recent Developments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volume 63, p. 9389–9403. 2015.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. *Plantas infestantes e nocivas*. 2.ed. São Bernardo do Campo: Editora Basf.; 978 páginas. 1999.

KITAJIMA S.; YAMAMOTO Y.; HIROOKA K.; TAKI C.; HIBINO S. Laticifers in mulberry exclusively accumulate defense proteins related to biotic stresses. *Plant Biotechnology*. Volume 30, p. 399–402. 2013.

KONNO, K.; HIRAYAMA, C.; NAKAMURA, M.; TATEISHI, K.; TAMURA, Y.; HATTORI, M.; Kohno, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant Journal*. Volume 37, P. 370–378. 2004.

KONNO K.. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry*. Volume 72(13), p. 1510–1530. 2011.

KULKARNI, A.; RAO, M. Differential elicitation of an aspartic protease inhibitor: Regulation of endogenous protease and initial events in germination in seeds of *Vigna radiata*. *Peptides*. Volume 30, nº 12, p. 2118-2126, 2009.

KUMAR A.; VIKAS SOLANKI; VERMA H. N.; BIKASH MANDAL. Characterisation and diagnosis of frangipani mosaic virus from India. *Virus Genes*. Volume 51, p. 310-314. 2015.

KUMARI, M.; SHARMA, A.; JAGANNADHAM, M. V. Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. *Food Chemistry*. Volume 131, p. 1295–1303. 2012.

KWON, C.W.; PARK K-M.; KANG, B.C.; KWEON D.H.; KIM, M.D.; SHIN S.W. Cysteine Protease Profiles of the Medicinal Plant *Calotropis procera* R. Br. Revealed by De Novo Transcriptome Analysis. **PLoS ONE**. Volume 10, p 1-15. 2015.

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

LAGUNA, L. E.; EGITO, E. S. Processamento do queijo de coalho fabricado com leite de cabra maturado e defumado. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. P. 1-6. 2010.

LEMES, A. C.; PAVÓN, Y.; LAZZARONI, S.; ROZYCKI, S.; BRANDELLI, A. KALIL S. J. A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development. **LWT - Food Science and Technology**. Volume 66, p. 217-224. 2016.

Li, S.; YANG, X.; ZHU, M. WANG, X. Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. **Technology prospecting on enzymes**. Volume 2, Issue: 3, September 2012.

LLERENA-SUSTER, C. R.; PRIOLO, N. S.; MORCELLE, S.R. Sodium tetrathionate effect on papain purification from different *Carica papaya* latex crude extracts. **Prep Biochem Biotechnol**. Volume 41(2), p.107-121. 2011.

LORENZI, H. E.; SOUZA, H. M. **Plantas Ornamentais no Brasil: Arbustivas, Herbáceas e Trepadeiras**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1999. 1088p.

LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. **Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002. 512 p.

MAHAJAN, R. T.; CHAUDHARI, G. M. Plant latex as vegetable source for milk clotting enzymes and their use in cheese preparation. **International Journal of Advanced Research**. Volume 2, Issue 5, p. 1173-1181. 2014.

MARQUARDT, L. BACCAR, N. M.; ROHFLES, A. L. B.; OLIVEIRA M. S. **Manual para elaboração de queijos diferenciados**. Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC. 2013.

MATOS, M. P. V. **Aspectos Bioquímicos e etnofarmacológicos do látex de *Himatanthus drasticus* Mart. (Plumel)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

MOUSINHO K.C.; OLIVEIRA C.C.; FERREIRA J.R.O.; CARVALHO A.A.; MAGALHÃES H.I.F., BEZERRA D.P., ALVES A.P.N.N., COSTA-LOTUFO L.V.; PESSOA C., DE MATOS MOSINHO, P.V. Antitumor effect of laticifer proteins of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel-Apocynaceae. **Journal of Ethnopharmacology**. Volume 137, p. 421-426. 2011.

MÓTYÁN, J. A.; TÓTH, F.; TŐZSÉR, J. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. **Biomolecules**. Volume 3, p. 923-942. 2013.

NASCIMENTO, G .V. CARDOSO, E. A.; BATISTA, N. L.; SOUZA B. B. CAMBUÍ G. B.

Indicadores produtivos, fisiológicos e comportamentais de vacas de leite. **Agropecuária Científica no Semiárido**. Volume 9, n. 4, p. 28-36, 2013.

NASSU, R. T.; ARAÚJO, R. S.; GUEDES, C. G. M.; ROCHA, R. G. A. Diagnóstico das Condições de Processamento e Caracterização Físico-Química de Queijos Regionais e Manteiga no Rio Grande do Norte. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 11. **EMBRAPA**. 2003.

NASSU, R. T.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P. Queijo de Coalho. **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 40. 2006.

NAZ, S.; MASUD, T.; NAWAZ, M.A. Characterization of milk coagulating properties from the extract of *Withania coagulans*. **International Journal of Dairy Technology**. Volume 62, p. 315-320. 2009.

NESTOR, G. M.; RUBÍ C. G. D.; HÉCTOR, J. C. Exploring the milk-clotting properties of a plant coagulant from the berries of *S. elaeagnifolium* var. Cavanillies. **J. Food Sci.** Volume 71, p. 89-94. 2012.

ORDIALES, E.; MARTÍN, A., BENITO, M.J., HERNÁNDEZ, A.; RUIZ-MOYANO; S.; GÓRDOBA M.G. Technological characterization by free zone capillary electrophoresis (FCZE) of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in “Torta del Casar” cheese-making. **Food Chemistry**, 133, pp. 227–235. 2012

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. Volume 2. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PACE N. J.; WEERAPANA, E. Diverse Functional Roles of Reactive Cysteines. **ACS Chemical Biology**. Volume 8, p. 283–296. 2013.

PEREIRA, C. I.; NETO D. M.; CAPUCHO, J.C., GIÃO, M.S., GOMES, A.M., MALCATA, F. X. How three adventitious lactic acid bacteria affect proteolysis and organic acid production in model Portuguese cheeses manufactured from several milk sources and two alternative coagulants. **Journal of Dairy Science**. Volume 93, p. 1335-2294. 2010.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**. Volume 27, No. 2, p. 293-300. 2004.

PICKARD W. F. Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. **New Phytologist**. Volume 177, p. 877–888. 2008.

PONTUAL, E.V., CARVALHO, B.E.A., BEZERRA, R.S., COELHO, L.C.B.B., NAPOLEÃO, T.H.; PAIVA, P.M.G. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. **Food Chemistry**, volume 135, p. 1848-1854. 2012.

RAMOS, M.V.; ARAÚJO, E.S.; JUCÁ T.L.; MONTEIRO-MOREIRA A.C.O.; VASCONCELOS I.M.; MOREIRA R.A.; VIANA C.A.; BELTRAMINI L.M.; PEREIRA D.A., MORENO F.B. New insights into the complex mixture of latex cysteine peptidases in *Calotropis procera*. **International Journal of Biological Macromolecules**. Volume 58, p.

211-219. 2013.

RAMOS, M.V., SOUZA, D.P., GOMES, M.T.R., FREITAS, C.D.T., CARVALHO, C.P.S., JÚNIOR, P.A.V.R., Salas, C.E. A Phytopathogenic Cysteine Peptidase from Latex of Wild Rubber Vine *Cryptostegia grandiflora*. **Protein Journal**. Volume 33, p. 199–209. 2014.

RAWDKUEN, S.; JAIMAKREU, M.; BENJAKUL, S. Physicochemical properties and tenderness of meat samples using proteolytic extract from *Calotropis procera* latex. **Food Chemistry**. Volume 136, p. 909–916. 2013.

RASKOVIC B.; LAZIC J.; POLOVIC N. Characterisation of general proteolytic, milk clotting and antifungal activity of *Ficus carica* latex during fruit ripening. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Volume 96, p. 576-582. 2016.

RAMOS, M. V; ARAÚJO, E. S.; OLIVEIRA, R. S. B. Latex fluids are endowed with insect repellent activity not specifically related to their proteins or volatile substances. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. Volume 23, n. 1, p. 57-66, 2011.

REZANEJADA, H.; KARBALAEI-HEIDARIA, H. R.; REZAEIA, S; YOUSEF, R. Microsciadin, a New Milk-Clotting Cysteine Protease from an Endemic Species, *Euphorbia microsciadia*. **Biomacromolecular Journal**. Volume 1, No. 1, p. 93-103. 2015.

SANTOS, M. V. ASPECTOS NÃO MICROBIOLÓGICOS AFETANDO A QUALIDADE DO LEITE. O Compromisso com a Qualidade do Leite. Passo Fundo: Editora UPF, 2004, v.1, p. 269-283. 2004.

SALAS, C.E.; GOMES, M.T.R.; HERNANDEZ, M.; LOPES, M.T.P. Plant cysteine proteinases: Evaluation of the pharmacological activity. **Phytochemistry**, 69, 2263–2269. 2008.

SALQUE, M; BOGUCKI P.; PYZEL, J.; SOBKOWIAK-TABAKA I.; GRYGIEL R.; SZMYT M.; EVERSLED R. Earliest evidence for cheese making in the sixth Millennium BC in northern Europe. **LETTER. Nature**. Volume 493. Janeiro, 2013. p. 522-525.

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

SGARBIERI, V.C.; GUPTA, S.M.; KRAMER D.E; WHITAKER, J.R. Ficus enzymes. Part I. Separation of proteolytic enzymes of *Ficus carica* and *Ficus glabrata* latices. **J. Biol. Chem.** Volume 39, p. 70-77. 1964.

SHAH, M. A.; MIR, S. A.; PARAY, M. A. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. **Dairy Sci. & Technol.** Volume 94, p. 5-16. 2014.

SHARMA A.; KUMARI M.; JAGANNADHAM MV. Religiosin C, a cucumisin-like serine protease from *Ficus religiosa*. **Process Biochem** volume 47, p. 914–921. 2012.

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

SHINDE P. R.; PATIL P. S.; BAIRAGI V. A. Phytopharmacological Review of Plumeria species. **Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP)**. Volume 3(2), p. 217-227. 2014.

SIKLOS M.; BENAÏSSA M.; THATCHER G. R. J. Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. Volume 5, p. 506-519. 2015.

SILVA, A. C.; NASCIMENTO, T. C. E. S.; SILVA, S. A.; HERCULANO, P. N.; MOREIRA K. A. Potential of quixaba (*Sideroxylon obtusifolium*) latex as a milk-clotting agente. **Food Science and Technology**. Volume 33(3), p. 494-499. 2013.

SINGH, S. J.; SINGH, L. R.; SANJENBAM, K. D.; SINGH, S. S.; DEVI, C. B.; RULLY, H. Purification and Characterization of a Thermostable Caseinolytic Serine Protease from the Latex of *Euphorbia heterophylla* L. **Protein & Peptide Letters**, Volume 22, p. 828-835. 2015.

SOUSA, E.L.; GRANGEIRO A.R.S.; BASTOS I.V.G.A.; RODRIGUES G.C.R.; ANJOS F.B.R.; SOUZA I.A.; SOUSA C.E.L. Antitumor activity of leaves of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel-Apocynaceae (janaguba) in the treatment of Sarcoma 180 tumor. **Braz. J. Pharm. Sci.**, Volume 46, p. 199-203. 2010.

SUMNER, I. G.; HARRIS, G.W.; TAYLOR, M. A. J.; PICKERSGILL, R. W.; OWEN, A. J.; GOODENOUGH, P. W. Factors effecting the thermostability of cysteine proteinases from *Carica papaya*. **European Journal of Biochemistry**, Volume 214, p. 129-134. 1993.

TAVANO, O.L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, volume 90, p. 1-11. 2013.

TAVARES, T. G.; MALCATA, F. X. The Portuguese Paradox: Why do some inhabitants of Portugal appear to live so long when their diet is based on whey cheese? **Food Chemistry**. Volume 131, p. 727-729, 2012.

TEIXEIRA, R.D., RIBEIRO, H.A.L., GOMES, M.T., LOPES, M.T.P., SALAS, C.E. The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 46, 956–961. 2008.

TOMAR, R.; KUMAR, R.; JAGANNADHAM, M. V. A stable serine protease, wrightin, from the latex of the plant *Wrightia tinctoria* (Roxb.) r. br.: Purification and biochemical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Volume 56, p. 1479–1487. 2008.

TORRES, M.J., TREJO, S.A., MARTIN, M.I., NATALUCCI, C.L., AVILÉS, F.X., LÓPEZ, L.M.I. Purification and Characterization of a Cysteine Endopeptidase from *Vasconcelle aquerifolia* A. St.-Hil. Latex Displaying High Substrate Specificity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Volume 58, p. 11027–11035. 2010.

TIWARI, K.C.; MAJUMDER, R.; BHATTACHARJEE, S. Folklore information from Assam

for family planning and birth control. **International Journal of Crude Drug Resistance**. Volume 20, n.3, p. 133-137. 1982.

TURK, B.; TURK, D.; TURK V. Protease signalling: the cutting edge. **The EMBO Journal**. European Molecular Biology Organization. Volume 31, p. 1630–164. 2012.

UABOI-EGBENNI, P.O.; OKOLIE, P.N.; AKINTUNDE, T. I.; BISI-JOHNSON, O., ENWE, L.; BESSONG, P.O. Proximate Analysis and Microbiological Quality of Cheese Produced from Raw Cow Milk Obtained from Fulani Settlement in Ogun State Nigeria, Using Lactic Acid Bacteria and Extract from Sodom Apple Leaf (*Calotropis procera*). **Pakistan Journal of Nutrition**. Volume 9 (9), p. 920-925, 2010.

VAIRO-CAVALLI S.; SILVA, S.V.; CIMINO, C.; MALCATA, F.X.; PRIOLO, N. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. **Food Chem**. Volume 106, p. 997–1003. 2008.

VAN DER HOORN, R. A. L.; Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**. Volume 59, p. 191–223. 2008.

VERMELHO A. B.; CARDOSO, V.; NASCIMENTO, R. P.; PINHEIRO, A. S. RODRIGUES, I. A. Application of Microbial Enzymes in the Food Industry, **Advances in Food Biotechnology**, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, p. 103–132, 2015.

VIANA, C. A.; OLIVEIRA, J. S.; FREITAS, C. D. T.; ALENCAR, N. M .N.; CARVALHO, C. P. S.; Beatriz Caroline Nishi; RAMOS, M. V. Thrombin and plasmin-like activities in the latices of *Cryptostegia grandiflora* and *Plumeria rubra*. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v. 25, p. 35-40, 2013.

VISHWANATHA, K. S.; A.; APPU G. Rao; SINGH, S. A. Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Appl Microbiol Biotechnol**. Volume 85(6), p. 1849-1859. 2010.

XUE, Y.; NIE, H.; ZHU L.; LI S.; ZHANG H. Immobilization of Modified Papain with Anhydride Groups on Activated Cotton Fabric. **Applied Biochemistry Biotechnology**. Volume 160, p. 109-121. 2010.

YADAV R. P.; PATEL, A. K.; JAGANNADHAM, M. V. Neriifolin S, a dimeric serine protease from *Euphorbia neriifolia* Linn.: purification and biochemical characterisation. **Food Chem**. Volume 132, p. 1296-1304. 2012.

ZANELA, M. B.; RIBEIRO M. E. R.; BOTELHO V. A. R.; WEISSHEIMER, C. F; SAN MARTINS M. Qualidade Composicional do Leite de um rebanho Jersey no Sul do Rio Grande do Sul. Embrapa Gado de Leite. Documentos, 184. **XIII Congresso Internacional do Leite (anais)**. 2015.

ZHANG S.; DONG J.; CHENG H. Essential oil composition of the flowers of *Plumeria rubra* cv. acutifolia from China. **Chemistry of Natural Compounds**. Volume 52, No. 1, 2016.

ZHAO, P.; DENG S.; DING, Y. LYU, F. Optimization of additive combination based on L-cysteine for inhibition of nonenzymatic browning in cooked rice during storage. **Journal of Food Processing and Preservation**. Volume 39, p. 488-494. 2014.