



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS- UFAL
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA – IQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA - PPGQB

MARTA ANGELO DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE COAGULANTE DO EXTRATO DE SEMENTES DA
CHIA (*Salvia hispanica* L) NO LEITE BOVINO

MACEIÓ
2023

MARTA ANGELO DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE COAGULANTE DO EXTRATO DE SEMENTES DA
CHIA (*Salvia hispanica* L) NO LEITE BOVINO

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de pós-graduação em química e biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como requisito para a obtenção do grau de mestra em química.

Orientador: Prof. Dr. Francis Soares Gomes

MACEIÓ
2023

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S237a Santos, Marta Angelo dos.

Avaliação de atividade anticoagulante do extrato de sementes da Chia
(*Salvia hispanica* L) no leite bovino / Marta Angelo dos Santos. – 2023.
66 f. : il color.

Orientador: Francis Soares Gomes.

Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas.
Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em
Química e Biotecnologia. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 55-66.

1. Leite bovino - Coagulação. 2. Extratos vegetais. 3. Caseínas. I.
Título.

CDU: 637.147.2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de dissertação da mestranda **Marta Angelo dos Santos** intitulada: “**Avaliação da atividade coagulante do extrato das sementes da Chia (Salvia Hispânica L.) no leite bovino**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 28 de fevereiro de 2023, às 9h, na sala de reuniões do Instituto de Química e Biotecnologia/IQB.

Maceió, 28 de fevereiro de 2023.



Documento assinado digitalmente
CLAUDIO WILIAN VICTOR DOS SANTOS
Data: 28/02/2023 15:30:55-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Comissão Examinadora:

Dr. CLAUDIO WILIAN VICTOR DOS SANTOS, F.M.Nassau
Examinador Externo



Documento assinado digitalmente
HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA
Data: 28/02/2023 15:36:06-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA, UFAL
Examinador Interno



Documento assinado digitalmente
FRANCIS SOARES GOMES
Data: 28/02/2023 12:15:40-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. Dr. FRANCIS SOARES GOMES, UFAL
Presidente

Agradecimentos

Agradeço a Deus por todas as oportunidades que tive, por cada desafio superado e por sempre colocar pessoas com quem pudesse contar ao longo do caminho.

A minha mãe, Cida, por ser minha maior incentivadora, por sempre estar ao meu lado compartilhando os bons e maus momentos. Ao meu irmão, Isaac, por toda ajuda e por sempre ser alguém com quem sempre pude contar; Amo vocês.

Ao meu namorado Artur por todo companheirismo e ajuda ao longo de todo esse caminho.

As minhas amigas, Rosiellen e Luana, pela amizade e todos os bons momentos.

Aos amigos, Marta, Stella, Cledson, Ritomar, Janaina, Fabiana, Alexandra, Monizy, Thomás, Keylane e Anyelle por todos os momentos compartilhados.

Ao Josiel, por ter sido parte fundamental nesse projeto, me ajudando e sempre estando disponível em todos os momentos de necessidade.

A Camila Chicuta pela amizade e apoio, com quem pude dividir as preocupações e alegrias ao longo do projeto.

A Andrea por ser uma das pessoas mais positivas que conheço, por sempre ser capaz de incentivar a todos a sua volta.

Ao meu professor orientador, Dr Francis, pelo acolhimento no lab desde a iniciação científica, por toda ajuda, paciência e orientação. Aos demais professores do LAMP, professor Dr° Hugo e professora Dr° Edma.

Agradeço as agências de fomento CAPES e FAPEAL pelos recursos que tornaram a execução desse projeto possível.

A Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia e ao PPGQB.

E a todos que de alguma forma participaram dessa conquista!!

“Cegueira também é isto, viver num mundo onde se
tenha acabado a esperança”

José Saramago

Resumo

É possível observar o aumento na produção e consumo de queijos em todo o mundo, advindo do crescimento populacional. No entanto, devido a fatores como disponibilidade limitada da matéria bruta, o custo elevado do coalho, dieta vegetariana, alimentos geneticamente modificados e restrições religiosas, houve a necessidade de pesquisas que identifique novas fontes de matérias destinadas à produção de queijo, em diversas regiões do planeta. Como alternativa inovadora, proteases de origem vegetal vem ganhando destaque no processo de coagulação de leite. A chia (*Salvia hispanica* L.) é uma planta herbácea que pertence à família Lamiaceae. Suas sementes são fontes naturais de ácidos graxos, ômega-3, fibras e proteínas, além de outros componentes importantes, como os antioxidantes. Nesse contexto, este trabalho objetivou a aquisição de enzimas proteolíticas, com a capacidade de promoverem a coagulação do leite bovino a partir de uma preparação proteica obtida das sementes da *S. hispanica*. Para tanto foram preparados extratos das sementes de *S. hispanica* em tampão Tris-HCl, 50 mM pH 8,0. Posteriormente, foi avaliado efeito da concentração do extrato bruto na hidrólise do substrato azocaseína. A enzima apresentou temperatura ótima de 70 °C e pH ótimo de 4, e teve sua atividade melhorada na presença dos íons Ca²⁺, Mg²⁺ e K⁺. A atividade proteolítica do EB foi inibida por benzamidina, PMSF e DTT. A amostra exibiu uma elevada atividade coagulante do leite 33,33 UAC/mL, e essa atividade foi mais eficiente a temperatura de 50°C. Através do teste de coagulação do leite com o EB das sementes da *S. hispanica* foi possível a obtenção de um novo coagulante de leite.

Palavras-chave: Coagulação; extrato vegetal; caseína.

Abstract

It's possible to observe the increase in the production and consumption of cheese around the world, arising from population growth. However, due to factors such as limited availability of raw material, the high cost of rennet, vegetarian diet, genetically modified foods, and religious issues, there has been a need for research to identify new sources of materials for cheese production in various regions of the planet. As an innovative alternative, proteases of vegetable origin have been gaining prominence in the milk coagulation process. Chia (*Salvia hispanica* L.) is an herbaceous plant that belongs to the Lamiaceae family. Its seeds are natural sources of fatty acids, omega-3, fiber and protein, besides other important components, such as antioxidants. In this context, this work aimed the acquisition of proteolytic enzymes with the capacity of promoting the coagulation of bovine milk from a proteinic preparation obtained from the seeds of *S. hispanica*. For this, extracts of *S. hispanica* seeds were prepared in a buffer of Tris-HCl, 50 mM pH 8.0. Subsequently, the effect of the concentration of the crude extract on the hydrolysis of the substrate azocasein was evaluated. The enzyme had an optimum temperature of 70 °C and an optimum pH of 4, and its activity was enhanced in the presence of ions Ca²⁺, Mg²⁺ and K⁺. The proteolytic activity of EB was inhibited by benzamidine, PMSF and DTT. The sample exhibited a high milk coagulation activity 33,33 UAC/mL, and this activity was most efficient at a temperature of 50°C. Through the milk coagulation test with EB from the seeds of *S. hispanica*, a new milk coagulant was obtained.

Keywords: Coagulation; plant extract; casein

Lista de ilustrações

Figura 1: Produção brasileira de leite.....	14
Figure 2:Distribuição da produção do leite nos Estados brasileiros.....	15
Figure 3:Estrutura da lactose.....	17
Figure 4: Submicela e micela de caseína.....	20
Figure 5: Coagulação ácida.....	22
Figure 6: Alterações das micelas de caseína para formação da coalhada.....	23
Figure 7: Mecanismo proposto para ação das aspartil proteases.....	26
Figure 8: Mecanismo de reações catalisadas por serinas proteases.....	27
Figure 9: Mecanismo de reações catalisadas por cisteino proteases.....	28
Figure 10: plantação de chia (A) sementes de chia (B).....	29
Figure 11: Efeito da concentração do EB da Salvia hispânica L.....	39
Figure 12: Efeito do tempo de incubação na atividade proteolítica.....	40
Figure 13: Teste de inibição.....	41
Figure 14: Temperatura ótima da protease presente no EB da Salvia hispânica L.....	43
Figure 15: Estabilidade térmica da enzima presente no EB da Salvia Hispânica L.....	44
Figure 16: Efeito do pH sobre a atividade enzimática do EB das sementes da Salvia Hispânica L.....	45
Figure 17: Estabilidade ao pH das enzimas presentes no EB das sementes da Salvia Hispanica L.....	46
Figure 18: Avaliação da influência de íons metálicos na atividade enzimática do EB da Salvia Hispânica L.....	47
Figure 19: Zimografia do EB das sementes da Salvia hispânica L.....	48
Figure 20: Atividade coagulante do EB das sementes da Salvia Hispanica L., (B) Controle negativo (C1), (C2) e (C3) Triplicatas.....	48
Figure 21: Efeito da temperatura na atividade hidrolítica do EB das sementes da Salvia hispânica L.....	49
Figure 22: Efeito da temperatura 100 °C (B) Controle, (C1) (C2) e (C3) correspondem as triplicatas.....	50
Figure 23: Verificação da atividade coagulante por meio de eletroforese SDS-PAGE do soro do leite: Canaleta A- perfil de proteínas do soro antes da coagulação, B- soro do leite após a coagulação completa do leite.....	51
Figure 24: Verificação da atividade coagulante por meio da quantificação de proteínas presentes no soro de leite em diferentes tempos.....	52

Lista de tabelas

Tabela 1: Principais componentes do leite	16
Tabela 2: Composição da fração lipídica do leite.....	18
Tabela 3: Proteases vegetais com ação coagulante do leite bovino.....	25

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

mL	Mililitros
Min	Minutos
T	temperatura
t	Tempo
g	Gramas
Abia	Associação brasileira de Indústria e Alimentos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Sumário

1. Introdução	12
2 Fundamentação teórica	14
2.1 Consumo de leite e derivados	14
2.2 Leite bovino e seus principais componentes químicos.....	16
2.2.1 Lactose.....	16
2.2.2 Gordura	17
2.2.3 Minerais.....	19
2.2.4 Proteínas	19
2.3 Coagulação do leite	21
2.3.1 Coagulação ácida.....	21
2.3.2 Coagulação enzimática	22
2.4 Tipos de coagulantes enzimáticos	23
2.4.1 Coagulantes de origem animal.....	23
2.4.2 Coagulantes microbianos	24
2.4.3 Coagulantes vegetais.....	24
2.4.3.1 Proteases aspárticas	26
2.4.3.2 Serino proteases	26
2.4.3.3 Cisteína proteases.....	27
2.6 Salvia hispanica L	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4. METODOLOGIA	32
4.1 Coleta do material vegetal e preparação do extrato bruto das sementes da <i>Salvia hispanica L.</i>	32
4.2 Determinação da concentração de proteínas do EB da <i>Salvia hispânica L.</i>	32
4.3 Determinação da atividade proteolítica do EB da <i>Salvia hispânica L.</i>	32
4.3 Efeito da concentração do EB da <i>Salvia hispanica L.</i> na atividade proteolítica...32	
4.4 Efeito do período de incubação na atividade proteolítica do EB das sementes da <i>Salvia hispânica L.</i>	33
4.5 Efeito de inibidores na atividade proteolítica	33
4.6 Temperatura ótima	33
4.7 Efeito da temperatura sobre a estabilidade proteolítica.....	34
4.8 Efeito do pH sobre a atividade proteolítica	34
4.9 Efeito do pH sobre a estabilidade proteolítica:	35

4.10 Efeito de íons metálicos na atividade proteolítica:.....	35
4.11 Zimografia	35
4.12 Teste de coagulação do EB das sementes da <i>Salvia hispânica L.</i> com leite desnatado.....	36
4.13 Efeito da temperatura no processo de coagulação do leite	36
4.14 SDS-PAGE	37
5.0 Resultados e discussões	38
5.1 Preparo do extrato bruto e avaliação da atividade enzimática da <i>Salvia Hispânica L.</i>	38
5.2 Efeito do período de incubação na atividade proteolítica do EB das sementes da <i>Salvia hispânica L.</i>	39
5.3 Efeito de inibidores na atividade proteolítica	40
5.5 Temperatura ótima	42
5.6 Estabilidade térmica	43
5.7 pH ótimo	44
5.8 Estabilidade do pH	45
5.9 Influência de íons na atividade enzimática	46
5.4 Zimogafia.....	47
5.10 Teste de coagulação do leite do EB das sementes da <i>Salvia hispânica L.</i>	48
5.11 Efeito da temperatura no processo de coagulação do leite	49
5.12 Efeito da estabilidade térmica na coagulação do leite desnatado	49
5.13 verificação da hidrolise de caseína por eletroforese e dosagem de proteínas solúveis	50
6.0 Conclusão	53
Referências	54

1. Introdução

O Brasil está entre os 5 maiores produtores de leite do mundo sendo esse um dos produtos de maior importância na agropecuária brasileira. O Agronegócio do Leite e seus derivados exercem papel importante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população (EMBRAPA, 2019). A coagulação do leite é uma das etapas mais importante na produção de queijos, a qual visa concentrar a proteína do leite, também retendo a gordura. Esse processo de coagulação pode ocorrer através de dois mecanismos: coagulação ácida, que é obtida pela produção de ácido láctico pela fermentação das bactérias ou adição direta de ácidos no leite. O outro mecanismo é a utilização de enzimas proteolíticas, que podem ser de origem animal, microbianos e vegetais. (De Paula et al.,2009; Lucey et al.,2016)

Coagulantes vegetais tem se tornado uma fonte importante de enzimas proteolíticas para a coagulação do leite. A escolha de um coagulante adequado é importante devido ao crescimento global no consumo de queijo, junto com a redução da oferta de proteases animais, obtidas, por exemplo, a partir do coalho de bezerro (GOMEZ et al., 2001; Justina et al.,2018). As proteases de plantas são usadas na coagulação do leite e no processo de fabricação de queijos, especialmente nos países mediterrâneos, Oriente Médio, África Ocidental e Sul da Europa (Amira et al.,2017).

A *Salvia hispanica* L, conhecida popularmente como chia, sálvia espanhola, chia mexicana e chia preta, faz parte da dieta humana a mais de 5500 anos, desde as civilizações maias e astecas. Possui sementes oleaginosas e é rica em ácido linolênico e fibras dietéticas, vitaminas e minerais, como riboflavina, niacina, tiamina, cálcio, fósforo, potássio, zinco e cobre; foi declarada como um alimento funcional pelo Parlamento Europeu o que levou a sua maior utilização, principalmente na indústria alimentícia. (Cahill 2003) Beltran-Orozco e Romero 2003). Os componentes presentes em suas sementes auxiliam nas funções imunológicas, atuando na prevenção das doenças cardiovasculares e na preservação da integridade de membranas celulares e neurotransmissores, possuem atividade hipotrigliceridemiante, isto é, reduzem os níveis de triglicerídeos no sangue (Chicco A. et al., 2009; Alonso, 2010; Cahill, 2003; Beltran-Orozco e Romero 2003).

A chia possui grande potencial, principalmente na indústria alimentícia e farmacêutica sendo muito utilizada na preparação de suplementos nutricionais,

fabricação de barras, cereais matinais e biscoitos. Produtos a partir de chia, portanto, não representam riscos para o uso humano (Valdivia,2015; DUNN, 2010).

2 Fundamentação teórica

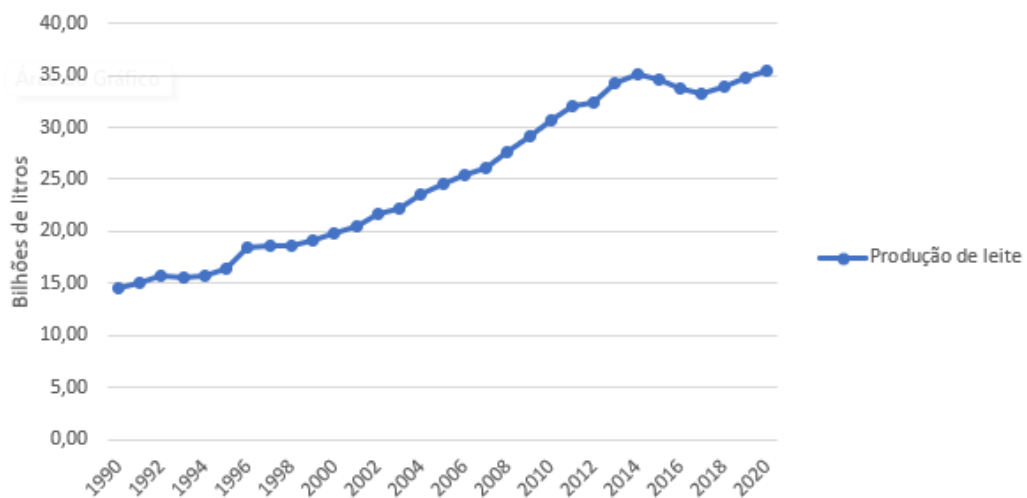
2.1 Consumo de leite e derivados

Além de possuir grande importância econômica, o leite e seus derivados são considerados um dos alimentos mais importantes e completos para a dieta humana, tendo seu consumo diário recomendado pois possui altas concentrações de macro e micronutrientes, como o cálcio, um nutriente necessário para a formação da estrutura óssea, sendo fonte também de magnésio, selênio, riboflavina, vitamina B12 e vitamina B5 (Muniz et al., 2013; Carvalho et al., 2018).

A produção mundial de leite cresceu em média 3,1% ao ano nos últimos 20 anos, aumentando cerca de 339 milhões de toneladas, um crescimento de 62% no período, totalizando uma produção de 532,3 milhões de toneladas no ano de 2020 (Embrapa, 2020).

O Brasil está entre os quatro maiores produtores de leite do mundo, chegando a produzir mais de 35 bilhões de litros no ano de 2020 de acordo com dados divulgados pelo IBGE (Figura 1). Sua produção está presente em mais de 99% dos municípios brasileiros e a produção de laticínios representa 5,4% do valor bruto de setor agropecuário e 17% da pecuária (Embrapa, 2019). Apesar do aumento no consumo de leite nas últimas duas décadas com um consumo per capita de 166,4 L/hab., esse valor ainda está abaixo do consumo observado em outros países desenvolvidos (Embrapa; Carvalho et al., 2018).

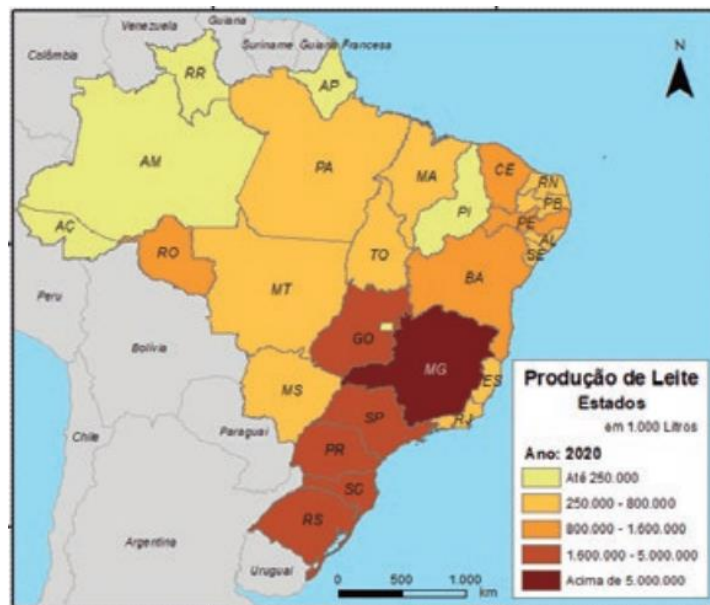
Figura 1: Produção brasileira de leite



Fonte: IBGE, 2021

Com um crescimento de 1,72% em 2020 quando comparado ao ano de 2019, os principais estados brasileiros que se destacaram na produção de leite são Minas Gerais 27,34%, Paraná 13,09%, Rio Grande do Sul 12,10%, Goiás 9% e Santa Catarina 8,85%. (fig. 2) (IBGE,2020). Juntos esses estados correspondem a mais de 70% da produção nacional, fazendo com que as regiões sudeste e sul se tornem responsáveis pela maior parte da produção de leite no país.

Figure 2:Distribuição da produção do leite nos Estados brasileiros



Fonte: IBGE,2020

De acordo com os dados mais recentes publicados pela Associação Brasileira da Indústria de Alimentos- ABIA, a indústria de laticínios é o segundo segmento mais importante na indústria de alimentos com um faturamento de R\$ 68,7 bilhões no ano de 2018. Os brasileiros consumiram em média, 32,2 kg de laticínios por ano (IBGE, 2019; Siqueira, 2021; Carvalho et al., 2018).

De acordo com dados do IBGE o valor de vendas da fabricação de laticínios fica atrás apenas do setor de carnes, açúcar, cerveja e refrigerante. Deste modo, o setor lácteo provoca mais riqueza que milho, soja e café.

Dentre os produtos lácteos mais consumidos no mundo estão, os lácteos frescos (incluindo leite fluido, iogurte, etc.), manteiga, queijos e leite em pó (Siqueira, 2019).

2.2 Leite bovino e seus principais componentes químicos

De acordo com a normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002, entende-se que o leite, é o produto obtido a partir da ordenha completa e ininterrupta, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas e sob condições de higiene. O leite de outros animais se deve denominar segundo sua espécie (Brasil,2002).

O leite é uma mistura aparentemente homogênea de várias substâncias, tendo em sua composição proteínas, lipídeos, carboidrato, sais, vitaminas entre outros componentes (Walter, C et al.,2020). Apesar da aparência homogênea, o leite é uma mistura heterogênea pois tem em sua composição uma dispersão coloidal que caso observada por um microscópio, será constatada a formação de micelas. Tendo em vista o seu alto grau de complexidade, existem diversos estudos de sua composição. A tabela 1 apresenta os principais componentes do leite. (Dupont, D. et al.,2020).

Tabela 1:Principais componentes do leite

COMPONENTE	PERCENTUAL DO LEITE
ÁGUA	86,0 a 88,0
SÓLIDOS TOTAIS	12,0 a 14,0
GORDURA	3,5 a 4,5
PROTEÍNA	3,2 a 3,5
LACTOSE	4,6 a 5,2
MINERAIS	0,7 a 0,8

Fonte: Adaptado de Felix H.D., 2001

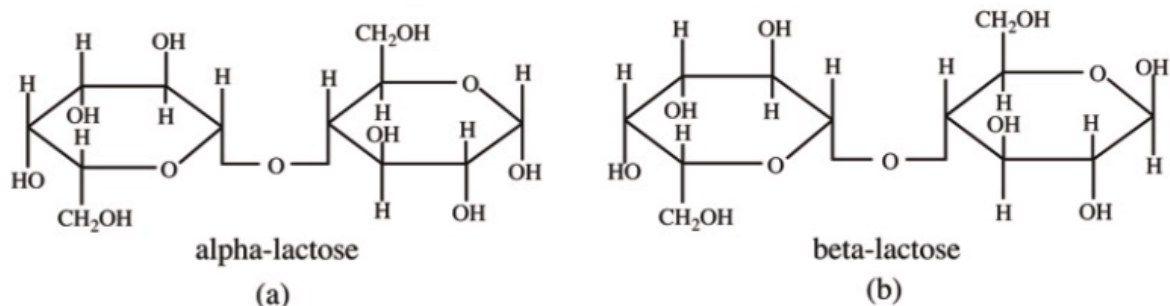
Além desses componentes também há a presença de vitaminas, bactérias, leucócitos e células mamárias secretoras, porém estão em menores quantidades. A composição do leite pode sofrer alterações de acordo com a nutrição do animal, a raça, a saúde (mastite e outras doenças), estágio de lactação, idade, intervalo entre ordenhas, entre outros fatores (Fox, P. F et al.,2015).

2.2.1 Lactose

A lactose, principal carboidrato do leite é um dissacarídeo redutor, e é também o componente mais abundante (além da água). Sua principal origem está na glicose do sangue (Walter et all.,2020). O tecido das glândulas mamárias isomeriza a glicose

à galactose e a liga a uma molécula de glicose, esta reação ocorre graças à atuação da lactose-sintetase. Essa junção ocorre através de uma ligação β -1,4-glicosídica. A figura 3 mostra essa estrutura formada. A lactose possui como principal função ser uma fonte de energia para o recém-nascido (Golding et al.,2020).

Figure 3:Estrutura da lactose



Fonte: Goulard et al.,2021

Em solução, a lactose existe em duas configurações básicas, α e β -lactose (fig. 3), que são convertidas entre si através de um processo chamado mutarrotação. Eles diferem na posição do grupo hidroxila no átomo C1 da molécula de glicose (Romero et al.,2019). a mutarrotação é um fenômeno característico de todo açúcar redutor em solução aquosa, essa alteração nas formas beta e alfa conferem propriedades físicas distintas a lactose, como diferentes solubilidades por exemplo (Perrone et al.,2011; Golding et al.,2020).

A produção desse carboidrato está diretamente relacionada com a capacidade de produção de leite, pois é o principal responsável por atrair a água para as células epiteliais mamárias por efeito osmótico. Outros carboidratos podem ser encontrados no leite, porém em quantidades menos significativas. (FÉLIX H. D., 2001).

2.2.2 Gordura

A gordura do leite é quimicamente complexa e está presente na forma de glóbulos com diâmetros que vão de 0,1 a de 22 μm (Oliveira et al.,2020) de todos os componentes do leite, é a fração que mais sofre variação e são normalmente divididas em três classes (Golding et al.,2020; Goldin et al.,2017):

1. Lipídios neutros: são os principais, com cerca de 98,5% da composição lipídica compõem-se principalmente de monoacilglicerídeos, diacilglicerídeos e triglicerídeos.

2. Lipídios polares: Uma mistura complexa de lipídios com cargas e centros de polarização. Alguns contêm ácidos fosfóricos, compostos contendo nitrogênio. Este tipo está presente no leite em níveis muito baixos (~1% do total de lipídios). São muito importantes no processo de emulsificação das gorduras do leite (Oliveira et al.,2020; Goldin et al.,2020).
3. Lipídios diversos: representam uma parcela muito pequena e são formados por um grupo heterogêneo, que não estão quimicamente relacionados entre si ou com lipídios neutros ou polares. Este grupo inclui colesterol; carotenoides; e as vitaminas lipossolúveis, A, D, E e K (Oliveira et al.,2020; Nörnberg et al.,2022).

Tabela 2: Composição da fração lipídica do leite

Lipídios apolares	Glicerídeos	Triglicerídeos	98%
		Diglicerídeos	0,3%
		Monoglicerídeos	0,03%
	Ácidos graxos livres		0,01%
Lipídios polares	Fosfolipídios	Fosfatidilcolina	0,26%
		Fosfatidiletanolamina	0,28%
		Fosfatidilserina	0,03%
		Fosfatidilinositol	0,04%
		Esfingomiéline	0,16%
		Lecitina	0,26%
Lipídios diversos	Insaponificáveis	Colesterol	0,3%
		Ésteres do colesterol	0,02%
		Carotenoides	0,002%
		Vitaminas A, E, D	

Fonte: Ordonez & Colaboradores

O principal componente lipídico do leite são os triglicerídeos, e eles podem variar muito, tanto de uma espécie para outra, quanto dentro da mesma espécie. Em animais ruminantes a proporção de ácidos graxos de cadeia curta e insaturada é bem maior do que nos monogástricos. Alguns pontos que podem modificar bastante as concentrações e composições dos lipídios são a nutrição animal e as condições ambientais (Golding et al.,2020; Fox et al.,2020; Mahony et al., 2020).

2.2.3 Minerais

Os minerais estão diretamente relacionados à formação de micelas de caseína, eles podem estar presentes em duas principais frações, a solúvel e a coloidal, onde a fração solúvel são íons solubilizados no leite, e a fração coloidal estão associados às micelas de caseína. Os principais minerais presentes são os cátions cálcio, magnésio, potássio e sódio (Mehta et al.,2015; Ordonez et all.,2005). Os principais ânions são cloreto, citrato e fosfato. A maior parte deles está majoritariamente em fase solúvel exceto por cálcio e fósforo que tem mais participação na precipitação e formação das micelas de caseína. Na fração coloidal, pode-se observar dois tipos de sais, íons ligados diretamente aos resíduos de aminoácidos. Cátions bivalentes fosfato e cálcio apresentam uma boa interação com caseína. Como regra geral, quanto mais fosforilada uma caseína, maior sua interação com cálcio (Walter et al.,2020; Gaucheron et all.,2005).

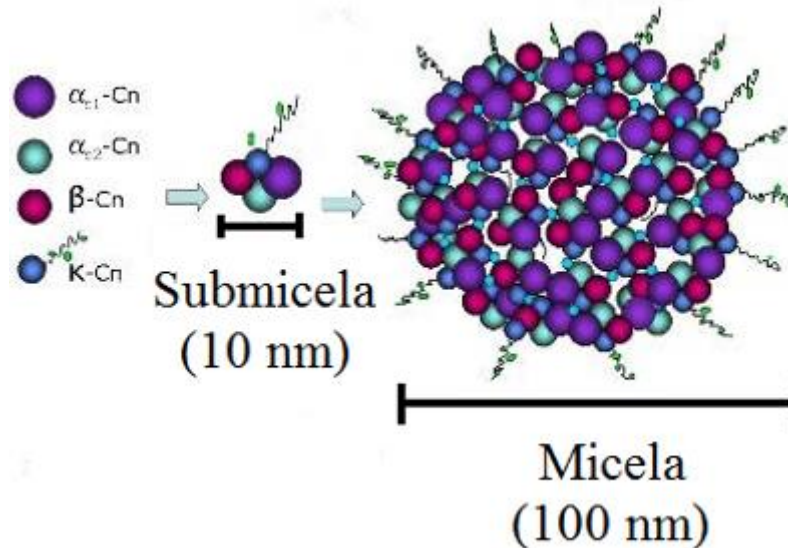
2.2.4 Proteínas

As principais proteínas do leite são as caseínas (os quatro tipos), responsáveis por cerca de 80% do total de proteínas no leite. Além delas há a presença de β -lactoglobulina e α -globulina, que são as proteínas do soro do leite de vaca, elas têm em sua composição mais aminoácidos essenciais o que faz delas melhores nutricionalmente do que a caseína. A α -lactoglobulina correspondente de 4% do total de proteínas já a β -lactoglobulina tem cerca de 16% (PONCE, 2001). Existem também outras proteínas no leite tais como enzimas, imunoglobinas e hormônios, apresentadas em pequenas quantidades e solubilizadas aos outros componentes do soro do leite (Boland Et al.,2019).

As proteínas mais abundantes, as caseínas, podem ser descritas como proteínas fosforiladas, de estrutura aberta e flexível que podem se apresentar em formas de micelas e têm uma função muito importante no transporte de minerais das fêmeas até as proles (Silva et al.,2019). As micelas formadas (fig 4) são compostas basicamente por moléculas de caseína, água e minerais e formam uma estrutura porosa altamente hidratadas, sua composição mineral representa de 6% a 8% da matéria seca. Eram chamadas simplesmente por caseínas as proteínas obtidas pela recuperação de precipitado formado pela acidificação do leite. (Golding et all.,2020; Mahony et all., 2020). Porém as técnicas de identificação melhoraram e hoje têm-se identificado quatro tipos de caseína, α_{S1} , α_{S2} , β e κ -caseínas. Que apresentam

diferentes composições de aminoácidos e uma grande diferenciação entre si devido a modificações pós-tradução. (BIJLA; HOLLAND; BOLAND, 2016). Uma dessas modificações é a glicosilação, que ocorre com os carboidratos, N-acetilgalactosamina, galactose, e ácido neuramínico. (SAITO; ITOH, 1992; TRAN; BAKER, 1970).

Figure 4: Submicela e micela de caseína



Fonte: De faria et al.,2016

As caseínas em maior quantidade são as α_{s1} -caseínas, cerca de 40% do total, já as α_{s2} -caseínas correspondem por 10%, esta é a mais hidrofílica de todas, tendo também a característica de serem as mais fosforiladas, o que faz que a α_{s2} -caseína seja mais facilmente precipitada ao entrar em contato com cálcio (Huppertz et al., 2013). Apenas 2mM de CaCl_2 são capazes de precipitar cerca de 90% das α_{s2} -caseínas. As β -caseínas representam cerca de 35% do total, sendo as mais hidrofóbica e fortemente anfifílicas, formando assim mais facilmente micelas. As κ -caseínas representam 15% e tem como característica única o fato de serem glicosiladas (SWAISGOOD, 2003). Cerca de 64% das κ -caseínas possuem de 1 a 10 carboidratos por molécula. (VREEMAN *et al.*, 1986; Silva et al.,2019).

Segundo Tuinier & Kruif (2002) a estabilidade das MC ocorre devido a contribuição estérica da camada externa da κ -caseína, que apresentam extremidades eletricamente carregadas, devido a presença de resíduos aspartil e glutamyl, e moléculas de ácido neuramínico que estão ligadas à κ -caseína, e estão ionizados no pH do leite.

Algumas técnicas como Microscopias de força atômica e eletrônica de varredura (Dalglish et al., 2004; Ouanezar et al., 2012) permitiram elucidar a estrutura das superfícies das micelas de caseína. A partir daí pode-se observar que as micelas são partículas esféricas e rugosas com diâmetros que variam de ~80 a 400 nm (Silva *et al.*, 2019).

A composição das micelas não é homogênea. Foi observado em alguns estudos que ao fracionar algumas micelas a composição relativa de caseínas não era alterada, exceto a κ -caseína que tinha sua quantidade alterada. A estrutura interna das micelas de caseína é ainda alvo de muito debate, porém sabe-se que é principalmente formada pelas demais formas de caseína (α_{s1} , α_{s2} e β -caseína) e também nano partículas de fosfato de cálcio coloidal (Dalglish, Douglas G, 2011; Mehta et al., 2015).

2.3 Coagulação do leite

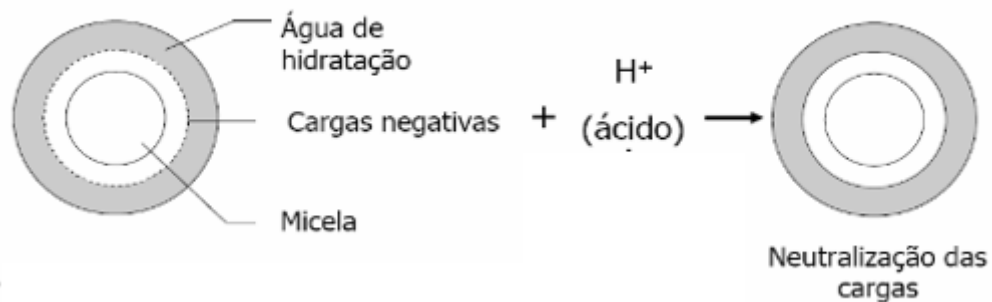
A coagulação do leite é uma etapa primordial na fabricação de queijos, é um processo de transformação do leite do estado líquido para gel. Durante o processo de coagulação a caseína e a gordura são concentradas enquanto os outros componentes são removidos com o soro. Essas transformações ocorrem através de modificações físico-químicas nas micelas de caseína, por meio de acidificação ou através de ação enzimática. (Troch, 2017; De Paula et al., 2009).

O processo de coagulação do leite pode ocorrer de duas formas, através de coagulação ácida ou por coagulação enzimática.

2.3.1 Coagulação ácida

Na coagulação ácida (fig 5), as micelas de caseína são coaguladas através da acidificação do leite, fazendo com que fosfato de cálcio coloidal se dissocie das micelas até o ponto isoelétrico da caseína em $\text{pH} = 4,6$. No pH normal do leite ($\text{pH}=6,6$), as micelas de caseína possuem um valor líquido de carga negativa ocasionando repulsão eletrostática. Os íons H^+ liberados pela acidificação neutralizam as cargas eletronegativas e gerando uma redução na solubilidade das caseínas. (Portiforio et al., 2018;)

Figure 5: Coagulação ácida



Fonte: Duarte, 2017

Essa coagulação pode ocorrer através de acidificação biológica com a adição de microrganismos que vão produzir enzimas convertedoras de lactose em ácido láctico por meio da fermentação ou pela adição de ácidos, como o ácido láctico, ácido cítrico ou pela adição de glucona- δ -lactona (GDL) (Troch, 2017; Phadungath., 2005; Lucey et al., 2016).

2.3.2 Coagulação enzimática

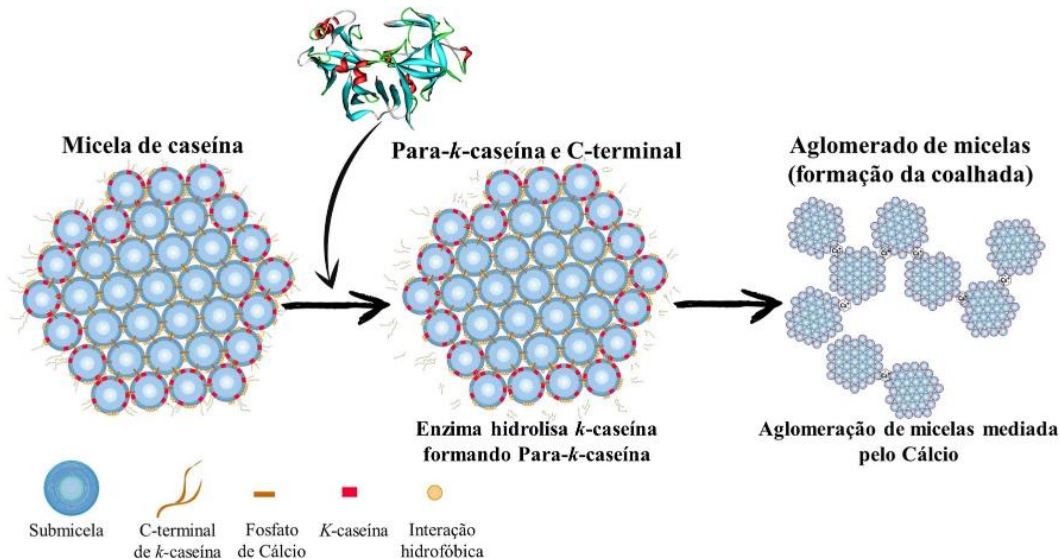
A coagulação do leite utilizando métodos enzimáticos é uma etapa primordial na produção de queijos. Essa coagulação ocorre através da ação de enzimas proteolíticas também chamadas de peptidases. Peptídeo hidrolases são enzimas hidrolíticas capazes de clivar às ligações peptídicas nas proteínas e resíduos de proteínas (Oliveira et al., 2012; Justina et al., 2018).

O processo ocorre através da adição de coalhos ou coagulantes específicos. O termo coalho é destinado a uma preparação enzimática extraída do abomaso dos bezerros onde está presente a quimosina e a pepsina. As demais enzimas utilizadas na coagulação do leite (coagulantes vegetais e microbianos) são chamadas de coagulantes. (Hachana et al., 2021)

O processo de coagulação enzimática pode ser dividido em 2 etapas (fig 6), onde inicialmente ocorre a hidrólise enzimática e posteriormente a agregação das micelas. Na primeira etapa a coalho ou outro coagulante enzimático cliva a ligação peptídica Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da K-caseína. A porção hidrofílica chamada de Caseína macropeptídeo é liberada da micela para o soro, causando a perda de um grupo carregado negativamente e diminuindo a estabilização das micelas. Quando 80-85% das K-caseínas são eliminadas a segunda etapa da coagulação é iniciada, que corresponde à agregação da para-caseína (fragmento hidrofóbico) formando uma

rede de gel tridimensional seguida de solidificação por meio de ligações cruzadas com o cálcio (Ca^{2+} livre) (Guiama et al 2010; Fox et al.,2017).

Figure 6: Alterações das micelas de caseína para formação da coalhada



Fonte: Munhoz,2020

2.4 Tipos de coagulantes enzimáticos

2.4.1 Coagulantes de origem animal

A utilização de coagulantes de origem animal para o processo de coagulação do leite é bastante antiga, tendo relatos de sua utilização há aproximadamente 5000 anos A.C. onde é sugerido que a estocagem do leite era feita em bolsas de peles ou estômagos de animais o que permitiu que o leite entrasse em contato com enzimas coagulantes do tecido animal e iniciasse o processo de coagulação durante a estocagem (De Paula et al.,2009).

Entre os coagulantes de origem animal, o coalho obtido do abomaso de ruminantes lactentes é considerado o mais adequado para a fabricação de queijos, pois apresenta um alto teor de quimosina. O coalho é constituído pelas enzimas quimosina e pepsina, em proporção de 85-95% de quimosina e de 5-15% de pepsina, essas proporções variam de acordo com a idade do animal e o tipo de alimentação. Enquanto a quimosina possui alta especificidade para hidrolisar caseínas, a pepsina é muito menos específica e hidrolisa ligações com resíduos Phe, Tyr, Leu ou Val (Jacob et al.,2011; Fernandes.,2013; Antunes et al.,2004).

2.4.2 Coagulantes microbianos

Os coagulantes de origem microbiana são mais aceitos por vegetarianos já que as enzimas não são derivadas de tecidos de ruminantes. As proteases extracelulares de origem microbiana atuam de forma semelhante à quimosina e são produzidas por fermentação (Jacob et al.,2011; Andrén et al.,2011).

Alguns microrganismos como *Rhizomucor miehei*, *R. pusillus*, *Endothia parasitica*, *Aspergillus oryzae* e *Irpex lactics* são usados para produção em larga escala de proteinases para serem utilizadas como coagulantes de leite (Vasconcelo et al.,2004; Neelakatan et al., 1999).

Para a obtenção da quimosina geneticamente modificada os genes da quimosina de ruminantes são inseridos em alguns microorganismos como os *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger var awamori* , *Escherichia coli*. Depois de inserido, este gene irá iniciar a produção da quimosina no microrganismo hospedeiro. Através dessa tecnologia de DNA recombinante, a quimosina obtida é 100% pura, ou seja, sem a presença da pepsina como acontece na obtenção do coalho do abomaso dos bezerros (Mohanty et al.,1999; Jacob et al., 2001; Kumar et al.,2010).

A utilização dessa enzima sofre algumas restrições ao consumo, pois a legislação europeia proíbe a participação de organismos geneticamente modificados na fabricação de queijos (Soares et al.,2015).

2.4.3 Coagulantes vegetais

Buscando alternativas para a substituição do coalho de origem animal devido ao alto preço, disponibilidade limitada, restrições religiosas (judaísmo e islamismo), dietas vegetarianas ou problemas advindos da utilização da quimosina recombinante, como relatado acima, os coagulantes vegetais têm ganhado destaque (Nicosia et al.,2022; Roseiro et al.,2003).

Extratos vegetais vem sendo utilizados na coagulação do leite desde a antiguidade. O relato mais antigo é de 50 A.C. por Lucius Junius Columella utilizando a flor, sementes e seiva do cártamo (*Cynara cardunculus L.*). O interesse na utilização de coagulantes vegetais tem sido cada vez maior devido à fácil disponibilidade e processos mais simples de purificação (Scott et al.,1998; GROZDANOVIC et al.,2013).

Extratos de plantas já são utilizados nos processos de produção de queijo, como extrato de *Cynara sp*, *Calotropis procera*, *Withania coagulans*, *Streblus asper*.

Até o momento os queijos produzidos com proteases vegetais são normalmente produzidos em escala artesanal, em pequenas queijarias, principalmente em países do mediterrâneo, Oriente Médio, África Ocidental e Sul da Europa (Liburdi et al.,2019; Roseiro et al.,2003; Low et al.,2006)

As proteases vegetais são encontradas em diversas espécies de plantas e em diferentes partes como folhas, flores, frutos, raízes, caules e sementes (tabela 3) estas proteases são classificadas de acordo com o mecanismo catalítico que será utilizado durante o processo hidrolítico (Nitu et al.,2005; Amira et al., 2017).

Dentre as proteases vegetais utilizadas como enzimas de coagulação do leite foram relatadas apenas proteases aspárticas, cisteína e serina proteases (Nitu et al.,2021).

Tabela 3: Proteases vegetais com ação coagulante do leite bovino

Fonte	Órgão	Tipo de enzima	Referência
<i>Cynara cardunculus</i>	flores	Protease aspártica	Sarmento, et al.,2005
<i>Oryza sativa</i>	Sementes	Protease aspártica	Asakura, et al.,1997
<i>Ficus carica sylvestris</i>	Caule e latex	Cisteína protease	Faccia, et al.,2012
<i>Helianthus annuus</i>	Sementes	Cisteína protease	Egito,et al.,2007
<i>Cucumis melo</i>	frutos	Serino protease	Uchikoba, et al.,2002
<i>Streblus asper</i>	Caule e látex	Serino protease	Tripathi, et al.,2011
<i>Melon (Cucumis melo)</i>	Sementes	Serino protease	Uchikoba & Kaneda, 1996
<i>Common fig (Ficus racemosa)</i>	Fruto	Cisteína protease	Devaraj et al., 2008

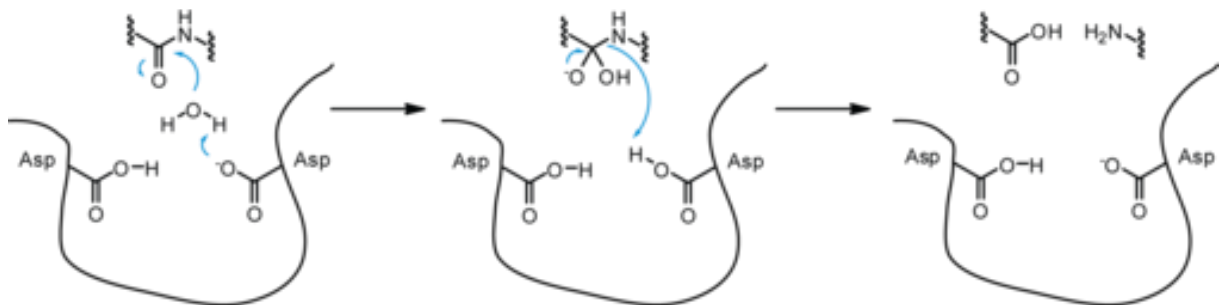
Fonte: Adaptado de AMIRA ET AL.,2017

2.4.3.1 Proteases aspárticas

As proteases aspárticas são endopeptidases que possuem duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico, participam da degradação de proteínas no processo de desenvolvimento da planta, mecanismos de armazenamento de proteínas, respostas ao estresse de patógenos e senescência da planta. Além das plantas essas endopeptidases podem ser encontradas em animais, fungos e vírus (Mamo et al.,2018; Amira et al.,2017). São mais ativas em pH ácido e a clivagem se dá em ligações de peptídeos entre resíduos de aminoácidos hidrofóbicos responsáveis pela atividade catalítica (Nitu et al.,2021).

No mecanismo proposto da ação das aspartil proteases (fig 7), os resíduos Asp são responsáveis por catalisar a hidrólise das ligações peptídicas. Um resíduo aspartil vai auxiliar a adição de uma molécula de água à carbonila da amida do substrato através de um ataque nucleofílico, formando assim um intermediário tetraédrico. Posteriormente, ocorre a quebra da ligação C-N com a formação de um ácido carboxílico e uma amina primária (Sodero et al.,2009; Muri et al.,2014).

Figure 7: Mecanismo proposto para ação das aspartil proteases



Fonte: Saguna et al.,1987

Essas enzimas geralmente apresentam boa atividade hidrolítica em pH ácido (Mendonça et al.,2011). O mecanismo de ação dessa protease ocorre via catálise ácido-base onde o resíduo Asp está carregado negativamente e vai agir como uma base, enquanto o outro resíduo Asp irá agir como um ácido e deve estar protonado (Sodero et al.,2009; Mendonça et al.,2011)

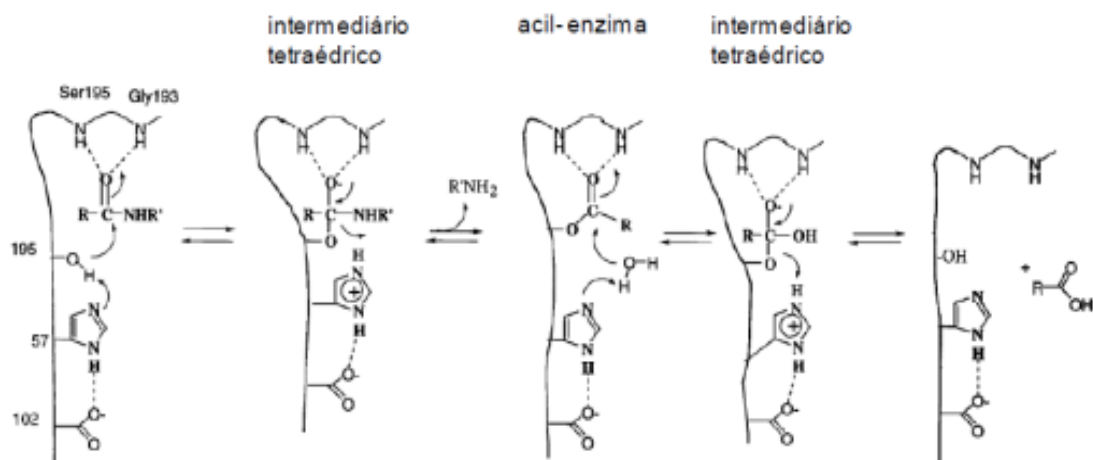
2.4.3.2 Serino proteases

As serino proteases possuem um resíduo de serina no seu centro ativo. Nas plantas, foram encontradas e extraídas de várias partes como látex, sementes, flores,

caules, folhas e raízes, participam de muitos processos fisiológicos, como microsporogênese, degradação de proteínas, transdução e diferenciação de sinal e na resposta de hipersensibilidade (Asif et al.,2006; Antão.,2005).

O mecanismo básico de ação das serino proteases (fig 8) envolve a transferência da porção acila do substrato para um grupo funcional da enzima. Inicialmente ocorre a formação de um éster entre o átomo de oxigênio da serina e a porção acila do substrato produzindo um intermediário tetraédrico, que desloca um par de elétrons para o oxigênio do grupo carbonil o tornando parcialmente negativo e quando a dupla ligação do grupo carbonil é restaurada por rearranjo eletrônico ocorre o rompimento da ligação peptídica, liberando a parte amina do substrato; em seguida, o ataque da água no intermediário acil-enzima, que o decompõe e libera o produto ácido regenerando a enzima (Antão,2009; Reis,2009).

Figure 8: Mecanismo de reações catalisadas por serinas proteases



Fonte: Redstrom, 2002

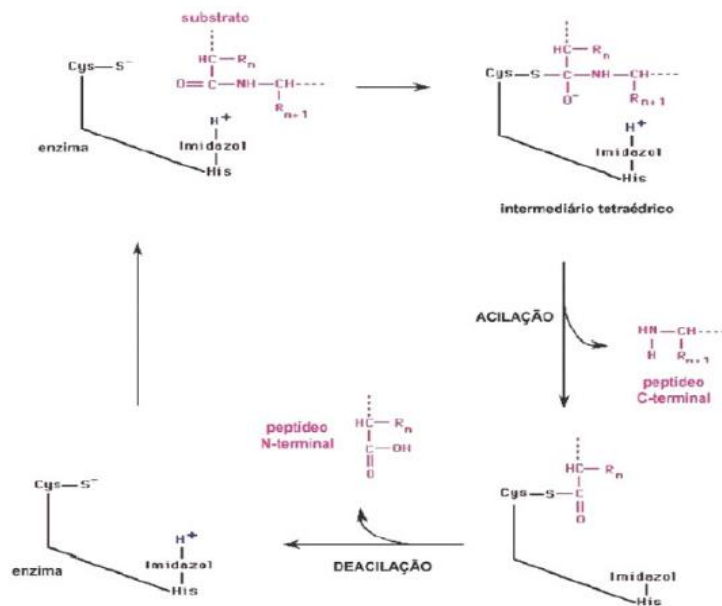
2.4.3.3 Cisteína proteases

As cisteínas proteases conhecidas também como tiol-proteases possuem um resíduo de cisteína no seu sítio ativo, apresentam massa molecular de 21 a 30 kDa e catalisam a hidrólise de ligações peptídicas, amida, éster, tiol éster e tiano éster. Essas proteases estão presentes na maioria dos organismos como bactérias, fungos, protozoários, animais e plantas (Grzonka et al.,2007; Shah et al., 2014).

A maioria das proteases isoladas de plantas pertencem à superfamília das cistinas e podem ser encontradas em diferentes tecidos. As cisteínas proteases participam de processos intra e extracelulares nas plantas como o desenvolvimento e amadurecimento do fruto, reserva nutricional, degradação da proteína de reserva em sementes de germinação (Vikash et al., 2005; Grudkowsk et al.,2004).

O mecanismo catalítico dessas enzimas (fig 9) envolve um grupo de cisteína no sítio ativo. A clivagem da ligação peptídica depende de um par de íons tiolato-imidazolio, que é fornecido pelos resíduos de cisteína e histidina no sítio ativo. O ataque nucleofílico ao grupo carbonila leva à formação de um intermediário oxianio tetraédrico que aceita um próton do grupo imidazólio formando um intermediário enzimático acil e liberando a porção C-terminal do substrato. Posteriormente, uma molécula de água promove o ataque nucleofílico ao intermediário enzima-acila liberando o substrato (BUTTLE et al., 2013; Verma et al.,2016).

Figure 9: Mecanismo de reações catalisadas por cisteino proteases



Fonte: Mendonça, 2018

2.6 *Salvia hispanica* L

A *Salvia hispanica* L. (fig. 10) conhecida popularmente como chia é uma planta herbácea, cultivada bianualmente, pertencente a família das Lamiaceae, é nativa do sul do México e da Guatemala, pode atingir até dois metros de altura, apresenta flores de (3-4 mm) de coloração azul ou branca e folhas que variam de oito a dez centímetros de comprimento e quatro a seis centímetros de largura; suas sementes apresentam coloração preto, cinza e branco, tendo forma é oval com tamanho variando de 1 a 2 mm.(Bonfim et al.,2006; Valdivia.,2015)

A chia é utilizada desde os tempos pré-colombianos principalmente pelos maias e astecas como forma de aumentar a resistência física, em rituais sagrados como oferenda, além de ser utilizada como medicamentos e tintas. As sementes são as partes mais consumidas e utilizadas da planta para a criação de medicamentos. Outras partes como folhas, ramos e raízes são usadas em menor quantidade contra infecções respiratórias (Coelho et al., 2014; MIGLIAVACCA.,2014)

Figure 10: plantação de chia (A) sementes de chia (B)



Fonte: Autor, 2022. Adaptado de COELHO,2014

As sementes de chia possuem um alto valor nutricional, apresentando de 25-40% de óleo, onde 60% dele é formado de ômega-3, 15-25% de proteína; um alto valor quando comparado a outras culturas como milho, trigo, arroz, aveia e cevada, possui também gorduras, carboidratos, fibras dietéticas altas, cinzas, minerais, vitaminas, além de uma alta quantidade de antioxidantes (Norlaily et al.,2012).

A chia possui grande potencial, principalmente na indústria alimentícia e farmacêutica sendo muito utilizada na preparação de suplementos nutricionais,

fabricação de barras, cereais matinais e biscoitos. Estudos comprovaram que essas sementes aumentam o índice de saciedade devido ao alta quantidade de fibras, além de prevenir doenças cardiovasculares, distúrbios inflamatórios e do sistema nervoso, diabetes, entre outros (Valdivia,2015; DUNN, 2010).

Apesar de ser cultivada principalmente em países como, Guatemala, Colômbia, Bolívia, Austrália, Paraguai, Nicarágua, Perú, México e Argentina, no Brasil, o cultivo de *S. hispanica L.* tem despertado o interesse dos produtores devido a crescente demanda por produtos alimentícios funcionais, sendo as regiões do oeste Paranaense e noroeste do Rio Grande do Sul os principais cultivadores comerciais dessa planta (Paiva et al.,2018; Chan et al.,2020; Costa et al.,2021).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliação da atividade coagulante do extrato das sementes de *Salvia hispânica* L. no leite bovino.

3.2 Objetivos específicos

1. Preparar o extrato das sementes de *Salvia hispanica* L.;
2. Determinar atividade proteolítica do extrato bruto, utilizando azocaseína;
3. Avaliar temperatura e pH na atividade proteolítica, utilizando azocaseína como substrato;
4. Realizar teste de inibição
5. Avaliar a influência de íons metálicos na atividade proteolítica
6. Avaliar a atividade coagulante do EB em preparações de leite bovino desnatado;
7. Determinar o efeito da temperatura na coagulação do leite

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta do material vegetal e preparação do extrato bruto das sementes da *Salvia hispanica L.*

As sementes de chia (*Salvia hispanica L.*) foram obtidas comercialmente. Para o preparo do extrato bruto as sementes foram pesadas em uma balança analítica (11,0g), e em seguida trituradas com o auxílio de um almofariz e pistilo em tampão de extração (Tris-HCl, 50 mM pH 8,0) na proporção de 1:10 (m/v). Em seguida a solução foi mantida sob agitação por 16 horas a uma temperatura de 4°C. Após as 16 hrs o extrato foi submetido a filtração, os precipitados foram descartados e o sobrenadante utilizado para as demais análises experimentais.

4.2 Determinação da concentração de proteínas do EB da *Salvia hispânica L.*

A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford(1976) usando albumina de soro bovino como padrão. Foram utilizadas alíquotas de 10 µL das amostras, e adicionado 190 µL de reagente de Bradford. Posteriormente as amostras foram incubadas por 5 minutos e medida a absorbância a 595 nm.

4.3 Determinação da atividade proteolítica do EB da *Salvia hispânica L.*

A atividade proteolítica foi avaliada segundo o método de Alencar et al. (2003) com adaptações, utilizando 150µL de azocaseína 0,6% (w/v), 50µL do extrato enzimático. A mistura reacional foi incubada por 1 hora, à temperatura ambiente e posteriormente interrompida pela adição de 100µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v), sendo centrifugada por 10 minutos, posteriormente foram coletados 200 µL da reação para leitura no comprimento de onda de 366 nm. Uma unidade de atividade proteolítica (U) foi definida como a variação de 0,01 na absorbância.

4.3 Efeito da concentração do EB da *Salvia hispanica L.* na atividade proteolítica

Buscando eliminar a influência de interferentes, como a intensa pigmentação do extrato por exemplo que pode interferir na quantificação exata da atividade enzimática, a concentração enzimática foi avaliada em função do volume do extrato. Os ensaios foram realizados em triplicata, e diferentes volumes do extrato bruto utilizados na reação (10, 20, 30, 40, 50 µL), em seguida foram adicionados 150 µL de azocaseína 0,6% (w/v), e a solução de Triton x-100 a 0,1%(w/v) necessária para completar o volume para 200 µL. posteriormente a amostra foi deixada em banho

maria a 37 °C por 1 hora e após esse período a reação foi encerrada com ácido tricloroacético. Os brancos de cada triplicata são constituídos dos mesmos elementos das triplicatas, porém o ácido tricloroacético foi adicionado imediatamente após a adição da enzima. Depois do encerramento das reações as amostras foram armazenadas a 8 °C por 30 minutos e depois sofreram centrifugação por 10 minutos a 1400 rpm. Por fim foi feita a leitura no espectrofotômetro a 366 nm.

4.4 Efeito do período de incubação na atividade proteolítica do EB das sementes da *Salvia hispânica L.*

Foi avaliado a hidrólise do substrato azocaseína em diferentes intervalos de tempo (10, 20, 30, 40, 50 e 60min). Onde foram utilizados 50µL do extrato bruto, seguindo as mesmas proporções do ensaio enzimático descrito anteriormente, assim como toda metodologia experimental supracitada.

4.5 Efeito de inibidores na atividade proteolítica

O efeito de diferentes inibidores enzimáticos sobre a atividade proteolítica foi testado utilizando EDTA, DTT, 2-mercaptoetanol, PMSF, Benzamidina. Todos os inibidores foram usados nas concentrações de 1 mM. O controle positivo foi a reação sem a presença dos inibidores e foi considerada 100% da atividade. Foram adicionados 10 µL de inibidor e 50 µL de amostra que permaneceram a 37° por 30 min. Após esse período, foram adicionados 150 µL de azocaseína 0,6% (w/v) e 40 µL de triton X-100 a 0,1% (w/v). As reações condicionadas em banho-maria por 1 h, e após esse tempo, foi encerrada cada reação com adição de 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (w/v). Os brancos de cada triplicata foram preparados da mesma forma que suas respectivas reações, com a exceção de que foram preparados com a adição do ácido tricloroacético imediatamente após a adição da enzima. Após o encerramento das reações, foram armazenadas a 8°C por 30 min e depois sofreram centrifugação por 10 min. Foram coletados 200 µL de cada reação para leitura no comprimento de onda de 366 nm.

4.6 Temperatura ótima

O efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica foi testado nas temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C. Foram preparadas reações contendo 150 µL de azocaseína 0,6% (w/v), 40 µL de triton X-100 a 0,1% (w/v), e 50 µL de amostra. A atividade em cada temperatura foi realizada por triplicata das reações

condicionados em banho-maria por 1 h, e após esse tempo, foi encerrada cada reação com adição de 100 μ L de ácido tricloroacético a 10% (w/v). Os brancos de cada triplicata são constituídos dos mesmos elementos das reações, com a exceção de que foram preparados com a adição do ácido tricloroacético imediatamente após a adição da enzima. Após o encerramento das reações, foram armazenadas a 8°C por 30 min e depois sofreram centrifugação por 10 min. Foram coletados 200 μ L de cada reação para leitura em microplaca no comprimento de onda de 366 nm.

4.7 Efeito da temperatura sobre a estabilidade proteolítica

O efeito da temperatura sobre a estabilidade proteolítica foi testado nas temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C. Foram adicionados nos tubos eppendorfs 40 μ L de solução tampão de tris-HCl 50 mM em pH=8,0 e 50 μ L de amostra que permaneceram na temperatura testada por 30 min. Após esse período, foram adicionados 150 μ L de azocaseína 0,6% (w/v) e 40 μ L de triton X-100 a 0,1% (w/v). A atividade em cada temperatura foi realizada por triplicata das reações condicionados em banho-maria por 1 h, e após esse tempo, foi encerrada cada reação com adição de 100 μ L de ácido tricloroacético a 10% (w/v). Os brancos de cada triplicata foram preparados da mesma forma que suas respectivas reações, com a exceção de que foram preparados com a adição do ácido tricloroacético imediatamente após a adição da enzima. Após o encerramento das reações, foram armazenadas a 8°C por 30 min e depois sofreram centrifugação por 10 min. Em seguida foi realizada a leitura das amostras em comprimento de onda de 366 nm.

4.8 Efeito do pH sobre a atividade proteolítica

O efeito do pH sobre a atividade proteolítica foi testado nos pHs 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11. As soluções tampão usadas foram os tampões acetato de sódio (pHs 4 e 5), fosfato de sódio (pHs 6, 7 e 11), tris-HCl (pH 8) e glicinato de sódio (pHs 9 e 10), todos a 100 mM, exceto quando discriminado. A reação foi realizada adicionando 50 μ L da amostra, 40 μ L dos respectivos tampões citados, 150 μ L de azocaseína 0,6% (w/v), 40 μ L de triton X-100 a 0,1% (w/v). A atividade em cada temperatura foi realizada por triplicata das reações condicionados em banho-maria por 1 h a 70 °C, e após esse tempo, foi encerrada cada reação com adição de 100 μ L de ácido tricloroacético a 10% (w/v). Os brancos de cada triplicata são constituídos dos mesmos elementos das reações, com a exceção de que foram preparados com a adição do ácido tricloroacético imediatamente após a adição da enzima. Após o encerramento das

reações, foram armazenadas a 8°C por 30 min e depois sofreram centrifugação por 10 min e posteriormente foi feita a leitura em microplaca no comprimento de onda de 366 nm.

4.9 Efeito do pH sobre a estabilidade proteolítica:

A estabilidade do pH foi analisada com os mesmos tampões descritos acima, foram adicionados 40 µL de solução tampão no pH testado e 50 µL de amostra que permaneceram a 37° por 30 min. Após esse período, foram adicionados 150 µL de azocaseína 0,6% (w/v) e 50 µL de Triton X-100 a 0,1% (w/v) preparado no tampão do pH de maior atividade em concentração de 500 mM. A atividade em cada temperatura foi realizada por triplicata das reações condicionados em banho-maria por 1 h na temperatura de maior atividade, e após esse tempo, foi encerrada cada reação com adição de 100 µL de ácido tricloroacético a 10% (w/v). Após o encerramento das reações, foram armazenadas a 8°C por 30 min e depois sofreram centrifugação por 10 min e posteriormente foi feita a leitura em microplaca no comprimento de onda de 366 nm.

4.10 Efeito de íons metálicos na atividade proteolítica:

O efeito de diferentes íons metálicos sobre a atividade proteolítica foi testado para os íons Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Zn^{2+} e Cu^{2+} todos preparados a 10mM. Foram adicionados 40µL das soluções contendo os metais, 50 µL da amostra, que permaneceram incubados a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente foram adicionados 150µL de azocaseína 0,6% (w/v) e 100 µL de Triton X-100 a 0,1% (w/v), em seguida foi colocado em banho-maria por 1 h na temperatura de maior atividade (70 °C), e após esse tempo, foi encerrada cada reação com adição de 100 µL de ácido tricloroacético a 10% (w/v). Após o encerramento das reações, foram armazenadas a 8°C por 30 min e depois sofreram centrifugação por 10 min e posteriormente foi feita a leitura em microplaca no comprimento de onda de 366 nm.

4.11 Zimografia

Foi realizado zimografia para verificar se a atividade enzimática permanecia ativa em suporte sólido. Para isso, efetuou-se uma eletroforese em condições nativas, em que a amostra não foi aquecida, e nem tratada com agentes redutores. A eletroforese foi desenvolvida de acordo com Laemmli (1970). Um gel foi preparado na concentração de 12% de poliacrilamida, com uma leve alteração, onde a água

adicionada no gel inferior foi substituída por uma solução de caseína a 0.4% (w/v). A corrida foi mantida a corrente constante (120mV). Após a conclusão da corrida eletroforética, o zimograma foi lavado (3 sessões) com tampão (Tris-HCl 50 mM, pH 8 + triton X-100 a 2,5%) por 15min. Em seguida, o zimograma foi incubado em tampão de extração por 24h a 37°C e, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue.

4.12 Teste de coagulação do EB das sementes da *Salvia hispânica L.* com leite desnatado

Essa metodologia foi ajustada a partir do descrito por Arima et al (1970), elaborada com uma solução de leite em pó desnatado a 10% (w/v), contendo 10mM de cloreto de cálcio e, o pH ajustado para 6.5 com HCl diluído. Para os ensaios de coagulação foram tomadas alíquotas de 1 mL de leite em pó desnatado reconstituído, distribuídos em triplicatas, os quais foram mantidos por 10 min a 37°C em banho maria. Em seguida, adicionou-se 200µL de extrato enzimático à solução de leite, onde foi observado o momento exato em que acontecia a total coagulação do leite. Uma unidade de atividade coagulante (MCU) foi definida como a quantidade de enzima necessária presente em 1 mL de extrato que coagulou 10 mL de substrato em 40 minutos e foi calculada de acordo com Shata (2005), conforme equação:

$$UAC / mL = \left[\frac{2400}{t} \times \frac{S}{E} \right]$$

Em que “S” é o volume do leite (mL); “t” o tempo de coagulação em segundos e “E” o volume de extrato enzimático aplicado (mL) (GAGAOUA et al., 2017).

4.13 Efeito da temperatura no processo de coagulação do leite

Para a verificação da temperatura em que ocorre a maior taxa de coagulação do leite, foi realizado ensaio em diferentes temperaturas. Foram tomadas alíquotas de 1 mL de leite em pó desnatado reconstituído, distribuídos em triplicatas, os quais foram mantidos em banho maria a temperatura de 37°C, 50 e 100°C. Em seguida, adicionou-se 200µL de extrato enzimático à solução de leite, onde foi observado o momento exato em que acontecia a total coagulação do leite, determinando assim a temperatura ótima de reação pelo menor tempo necessário para a obtenção do coágulo.

4.14 SDS-PAGE

De acordo com a metodologia descrita em LAEMMLI (1970) foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12%, usando 5% e 15% (m/v) para os géis de empilhamento e separação respectivamente. Posteriormente o gel foi mergulhado em solução comassie Brilliant Blue G-250 e H₂O: metanol (1:1) e posteriormente lavado em solução descorante 50% metanol e 10% ácido acético.

5.0 Resultados e discussões

5.1 Preparo do extrato bruto e avaliação da atividade enzimática da *Salvia Hispânica L.*

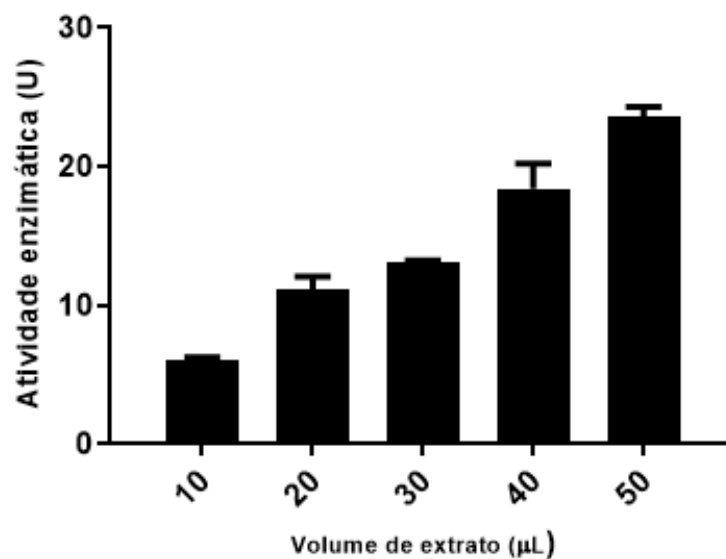
Após a preparação do extrato bruto da *Salvia hispânica L.* que apresentou uma concentração proteica de 1,83 mg/mL e buscando identificar a existência de enzimas proteolítica nesse EB, um ensaio enzimático utilizando o substrato azocaseína foi utilizado. O método utilizado para a determinação da atividade proteolítica utilizando a azocaseína foi inicialmente desenvolvido por Charney & Tomarelli (1947) onde a azocaseína é um derivado da caseína, que foi adicionado um grupo sulfonilamida, que confere a coloração vermelho-alaranjada ao substrato. A digestão da solução de azocaseína por enzimas proteolíticas vai resultar na formação de componente de cor alaranjado que são solúveis em ácido tricloroacético. A intensidade da cor desenvolvida no sobrenadante, resultante da centrifugação do substrato digerido após a adição do ácido tricloroacético, será função da atividade proteolítica da enzima na solução (Santos et al.,2005; Souza et al., 2012). Neste trabalho foi possível detectar a presença de atividade enzimática de 24,5U.

Por ser um substrato não específico a azocaseína pode sofrer degradação por diferentes tipos de proteases (Freitas et all.,2007), sendo utilizada para avaliar a atividade proteolítica total de diferentes extratos como das polpas das frutas da *Balanites aegyptiaca* (aspártico e serino proteases) (Beka et al., 2014) e *Bromelia antiacantha Bertol* (cisteíno protease) (Vallés et all., 2018), do látex da *Calotropis procera* (cisteína e aspártico proteases) (Freitas et all., 2007) e sementes da *Solanum dubium* (serino protease) (Ahmed et all.,2009).

Diversos estudos publicados demonstram a presença de atividade proteolítica em extratos vegetais, proteases obtidas a partir dessas fontes têm grande interesse industrial por apresentarem alta estabilidade em amplas faixas de pH e temperatura. As proteases vegetais vão desempenhar um papel essencial não só na degradação das proteínas, mas também são fundamentais em alguns processos reguladores associados ao crescimento, desenvolvimento e mudança ambiental. Além disso, essas proteases também agem em resposta ao stress, como em feridas, frio e seca, bem como no reconhecimento de agentes patogênicos e pragas e indução de respostas de defesa eficazes.(Freitas et all., 2018).

A atividade enzimática do EB foi avaliada em diferentes volumes (Figura 11). É possível observar na imagem que o aumento do volume do EB gerou aumento na atividade, esse aumento é previsto pois é gerado devido ao aumento da concentração da enzima, mostrando assim a relação direta entre a concentração enzimática e formação do produto

Figure 11: Efeito da concentração do EB da *Salvia hispânica L.*

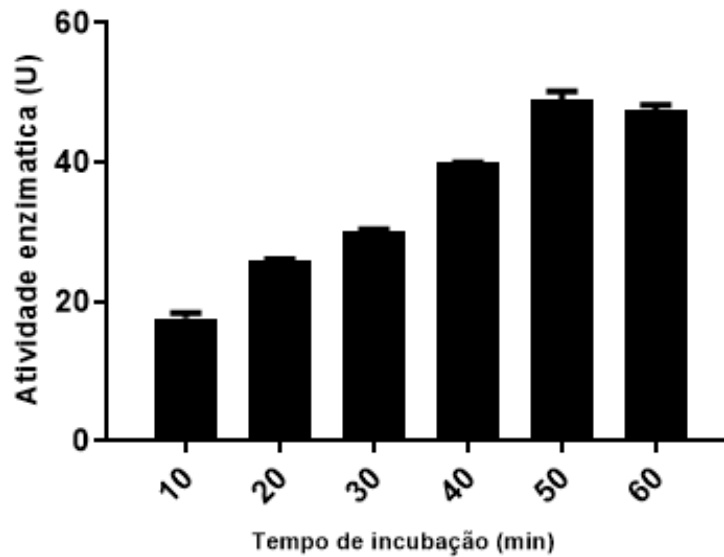


Fonte: autor 2022

5.2 Efeito do período de incubação na atividade proteolítica do EB das sementes da *Salvia hispânica L.*

Por se tratar de um extrato com pigmentação intensa, o que pode influenciar a absorvância, pois a cor é absorvida em determinada região do espectro de luz (GRIFFITHS et al.,2011), a atividade enzimática do EB foi avaliada em diferentes tempos de incubação, como é notado na figura 12 a absorvância aumenta com o tempo em decorrência da atividade enzimática ao longo do tempo de incubação do EB, demonstrando sua estabilidade nas condições testadas.

Figure 12: Efeito do tempo de incubação na atividade proteolítica



Fonte: autor,2022

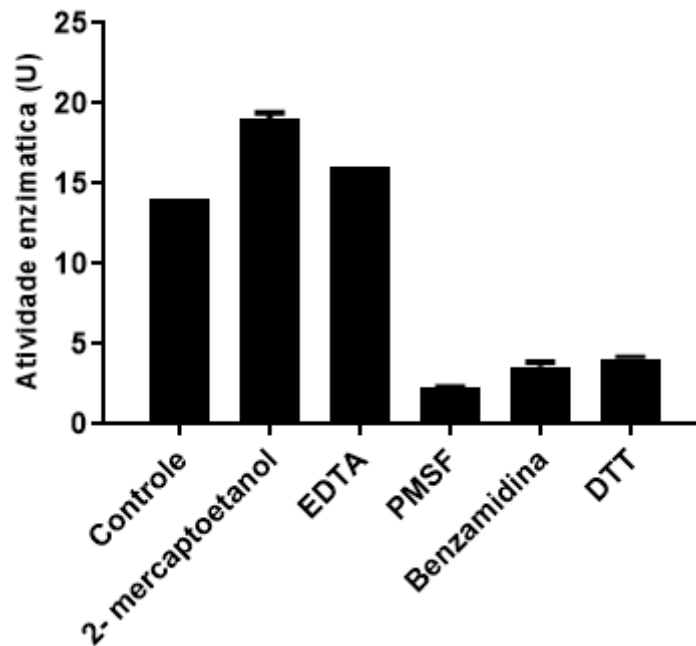
A partir dos resultados obtidos podemos observar que o aumento no tempo de incubação permitiu uma maior conversão do substrato em produto, e que mesmo após 60 minutos de reação a atividade proteolítica se manteve estável.

5.3 Efeito de inibidores na atividade proteolítica

Os inibidores de proteases são componentes que reduzem a taxa de hidrólise de um determinado substrato, podendo ser divididos em duas classes: irreversíveis, quando os inibidores através de ligações covalentes modificam a estrutura química e o sítio de ligação da enzima e os de ligações reversíveis que interagem com a enzima através de ligações não covalentes.

O extrato bruto da *Salvia Hispânica L.* teve sua atividade testada contra cinco inibidores diferentes, como pode ser observado a seguir:

Figure 13: Teste de inibição



Fonte: Autor, 2023

A enzima teve sua atividade inibida por benzanidina que é um inibidor competitivo reversível de serinas proteases, apresentando uma inibição de 74,28% da atividade. O PMSF que é um inibidor competitivo irreversível também para serino proteases reduziu a atividade enzimática em 84,3%, indicando assim a presença de serino proteases no extrato. O EDTA mostrou um aumento da atividade enzimática, por ser um inibidor de metaloproteases e um agente quelante de íons metálicos, ele pode agir retirando alguns íons metálicos com poder inibitório, podendo assim levar ao aumento da atividade enzimática.

O DTT que é um inibidor específico para cisteína proteases apresentou uma inibição de 70% da atividade, mostrando a presença de diferentes proteases no extrato. Porém quando adicionado o 2-mercaptoetanol que também é um inibidor de cisteína proteases, não ocorreu a inibição da atividade, isso pode ter ocorrido porque o mercaptoetanol que é altamente volátil promove a redução química das ligações de dissulfeto das proteínas através de uma reação de equilíbrio, onde as ligações dissulfeto estão constantemente sendo quebradas e restabelecidas. Porém quando comparado, o DTT apresenta mais vantagem pois é menos volátil o que leva a diminuição da variação de concentração ao longo da reação e a molécula de DTT sofre alterações durante a reação de redução das ligações dissulfeto da proteína,

passando de uma cadeia reta para uma estrutura anelar, dessa forma a reação se dá no sentido direto, não podendo assim cineticamente ir no sentido inverso, uma vez que não é uma reação de equilíbrio. Assim, as proteínas sulfídricas permanecem reduzidas assim que as suas ligações de dissulfeto são rompidas (Kurien et al., 2021)

Na literatura são relatados extratos vegetais que apresentam diferentes proteases, como o caso do extrato das sementes da *Moringa oleífera* que apresenta Serina e Cisteíno proteases (Wang et al., 2020). Beka et al. 2014 também relataram que extratos da polpa do fruto da *Balanites aegyptiaca* apresentou duas proteases diferentes uma pertencente a classe de proteases aspárticas e a outra pertencente a serinas proteases.

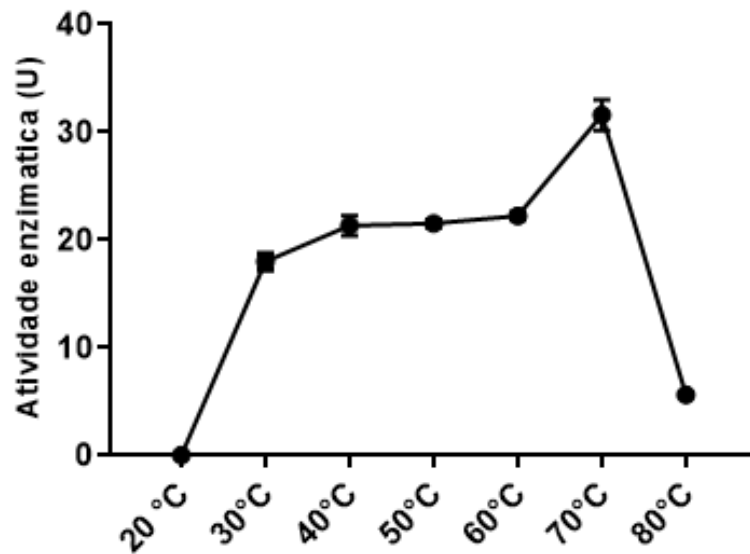
5.5 Temperatura ótima

A temperatura é um fator de extrema importância para a manutenção da atividade catalítica de uma enzima, pois o calor é um agente desnaturante (França et al., 2011). Cada enzima possui uma temperatura ótima, na qual a atividade enzimática aumenta com a temperatura a um nível máximo e depois diminui subitamente com um novo aumento da temperatura. (Daniel et al., 2008).

A temperatura pode influenciar a atividade enzimática de duas formas: Abaixo da temperatura ótima, as enzimas devem colidir e se ligar com os substratos no seu sítio ativo para que ocorra a conversão dos substratos em produtos. O aumento da temperatura do sistema catalítico irá aumentar o grau de agitação das moléculas, aumentando assim as colisões entre as enzimas e os substratos, resultando numa reação mais rápida. Porém acima da temperatura ótima, a energia interna das moléculas enzimáticas aumenta desfazendo algumas das ligações de hidrogénio que determinam a forma tridimensional da enzima, levando a sua desnaturação (Cao et al., 2016; Daniel et al., 2008).

A atividade proteolítica da enzima foi testada em diferentes temperaturas e os resultados obtidos na Fig. 14 mostraram que a atividade enzimática aumentou à medida que a temperatura aumenta, apresentando uma temperatura ótima de 70 °C.

Figure 14: Temperatura ótica da protease presente no EB da *Salvia hispânica L.*



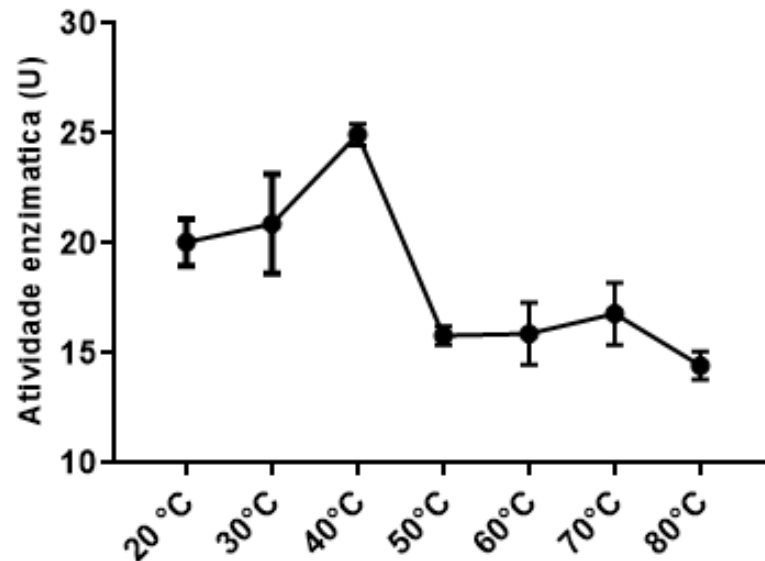
Fonte: Autor,2023

Alguns trabalhos na literatura relatam a mesma temperatura ótica para algumas enzimas de origem vegetal (Ahmed et al.,2009; Valles et al.,2018; Amid et all.,2014). E acima dessa temperatura ocorre a diminuição da atividade iniciando o processo de desnaturação da proteína.

5.6 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da protease foi avaliada em diferentes temperaturas, de 20 a 80 °C. Como pode ser observado na figura 15. A estabilidade térmica da enzima é maior a 40 °C e acima dessa temperatura ela sofre uma redução da sua atividade se mantendo constante de 50 a 80 °C.

Figure 15: Estabilidade térmica da enzima presente no EB da *Salvia Hispânica L.*



Fonte: Autor 2023

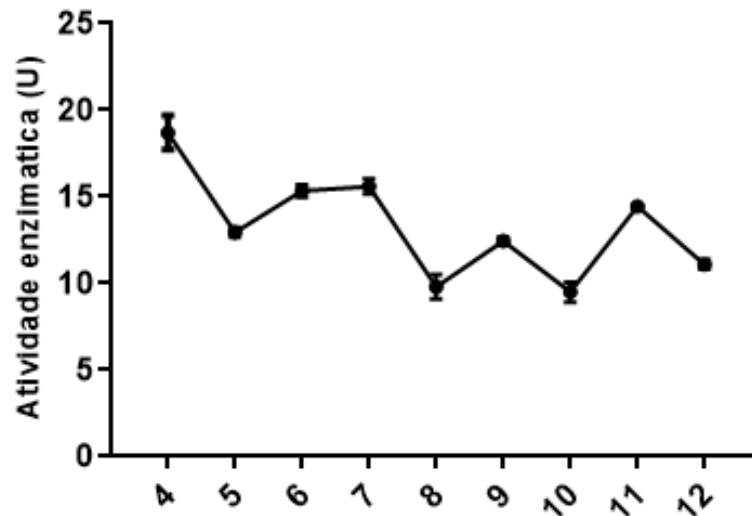
A estabilidade térmica das enzimas é uma característica importante para sua aplicação biotecnológica. Enzimas termoestáveis, são vantajosas para a aplicação na indústria, uma vez que alguns processos biotecnológicos que são conduzidos em temperaturas elevadas correm o risco de contaminação por microrganismos mesófilos, que são a maioria em um ambiente industrial. (Gomes et al., 2007)

5.7 pH ótimo

Enzimas possuem um pH onde apresentará sua atividade máxima, essa influência do pH está correlacionada com o estado de ionização de resíduos de aminoácidos da enzima. As cadeias laterais dos aminoácidos no sítio ativo podem atuar como base ou ácido fraco, podendo ser protonados e desprotonados de acordo com o meio (Grzonka et al., 2001).

O efeito do pH na atividade enzimática está representado na figura 16. Podemos observar que o perfil de atividade do extrato enzimático mostra 5 picos de atividade, no pH 4,0; 6,0-7,0; 9,0 e 11,0. O resultado demonstra a presença de diferentes enzimas o que entra em acordo com o resultado observado no teste de inibição enzimática, indicando assim que proteases ácidas, neutras e alcalinas também estavam presentes. Entre os valores de pH testados o nível mais alto de atividade foi detectado em pH 4,0.

Figure 16: Efeito do pH sobre a atividade enzimática do EB das sementes da *Salvia Hispânica* L.



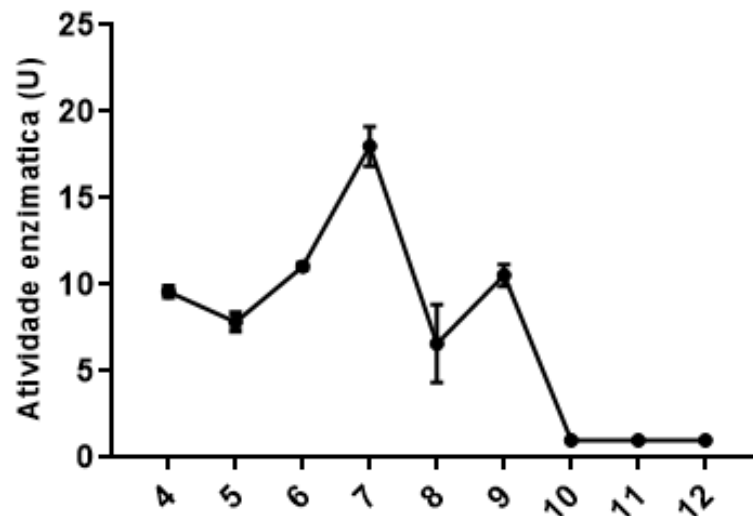
Fonte: Autor 2023

De acordo com o resultado obtido através do teste de inibição podemos sugerir a presença de diferentes proteases no EB, cisteíno e serina proteases, com isso a atividade observada em pH ácido pode ser explicada pela presença de cisteíno proteases que são enzimas que apresentam sua atividade proteolítica máxima em faixas de pH ácido 4,0–6,5 (Grzonka et al.,2001). Já as serinas proteases geralmente são ativas em pH neutro e alcalino, com atividade ótima do pH entre 7.0 e 11.0(Amid et al.,2014).

5.8 Estabilidade do pH

A estabilidade da enzima ao pH é uma propriedade importante, principalmente para determinar sua aplicação industrial (Mazorra et al.,2013). O teste de estabilidade em diferentes pH (Figura 17) mostrou que a enzima apresentou uma maior atividade em pH=7 e perde totalmente sua atividade a partir do pH 10.

Figure 17: Estabilidade ao pH das enzimas presentes no EB das sementes da *Salvia Hispanica L.*



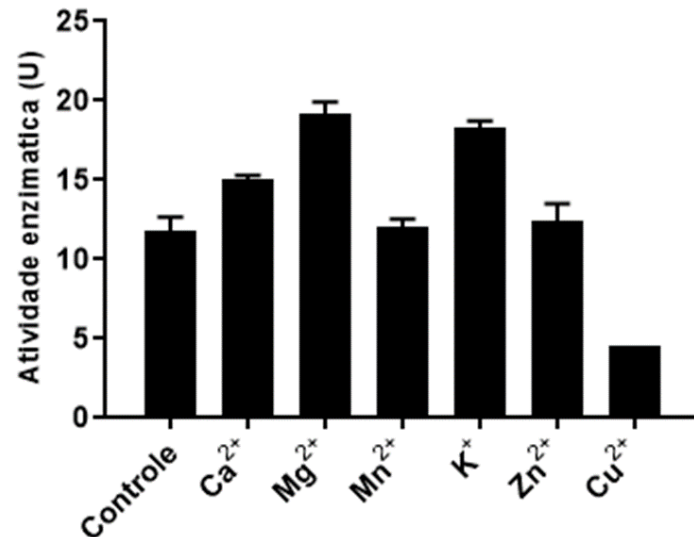
Fonte: Autor,2023

5.9 Influência de íons na atividade enzimática

Algumas enzimas, precisam de íons metálicos para desempenharem sua função catalítica. Esses íons metálicos podem se ligar através de ligações covalentes aos aminoácidos da cadeia proteica participando da reação catalítica ou podem se juntar à enzima no momento da catálise. Entretanto alguns desses íons podem alterar a estrutura e inibir a atividade das enzimas. A influência de diferentes íons metálicos sobre as enzimas varia e depende das características de cada enzima. (Pacheco et al.,2021; Punekar et al.,2018).

A influência de íons metálicos na atividade da enzima pode ser observada na imagem 18. Podemos perceber que os íons Mn^{2+} e Zn^{2+} não influenciaram na atividade, porém os íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+ promoveram o aumento da atividade enzimática, ao contrário dos íons Cu^{2+} que reduziu a atividade enzimática.

Figure 18: Avaliação da influência de íons metálicos na atividade enzimática do EB da *Salvia Hispânica L.*



Fonte: Autor, 2023

5.4 Zimografia

A zimografia é uma técnica que permite a detecção da atividade proteolítica, ela consiste em uma eletroforese em gel de poliacrilamida, que permite identificar a atividade enzimática, a partir da degradação de seu substrato (caseína) que está copolimerizado no gel.(DE MEDEIROS.,2012).

Na zimografia realizada nesse trabalho foi possível observar que a enzima presente no EB da *Salvia hispânica L.* é de fato uma protease pois ela digeriu as proteínas presentes no gel, sendo possível observar o clareamento da canaleta onde a amostra foi aplicada (Figura 19).

Figure 19: Zimografia do EB das sementes da *Salvia hispânica L.*



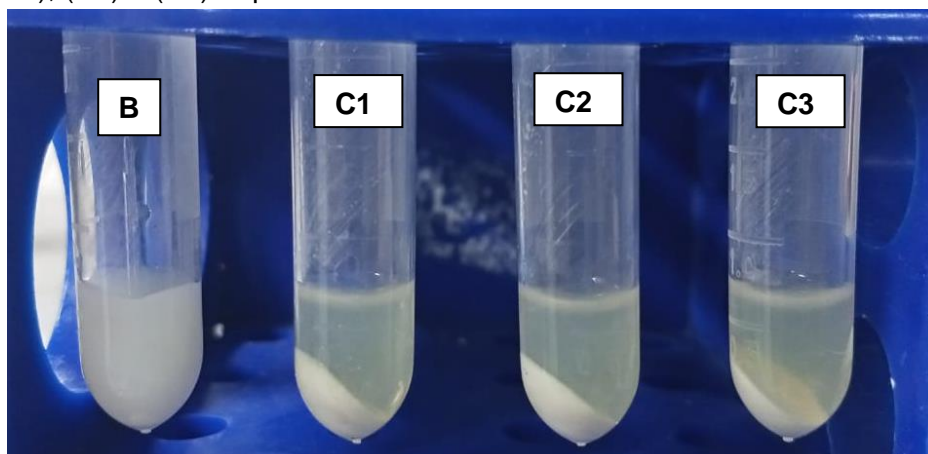
Fonte: Autor,2022

5.10 Teste de coagulação do leite do EB das sementes da *Salvia hispânica L.*

Através da metodologia utilizada foi possível concluir que o extrato bruto enzimático apresentou atividade coagulante do leite bovino (Figura 20) com uma atividade específica de 33,3 UAC/mL. Indicando o potencial das sementes da *Salvia hispânica L.* como fonte de enzimas proteolíticas com potencial biotecnológico para aplicação na produção de queijos.

Outros trabalhos relatam a mesma ação biotecnológica de extratos vegetais, porém com menor atividade coagulante como os extratos enzimáticos da *Bromelia pinguin* 2,59 U/mg (Moreno et al.,2017), *Vallesia glabra* 0,20 U/mL(González et al.,2021), *Ficus Johannis* 28,88 U/mL (Afsharnezhad et al.,2019).

Figure 20: Atividade coagulante do EB das sementes da *Salvia Hispanica L.*, (B) Controle negativo (C1), (C2) e (C3) Triplicatas



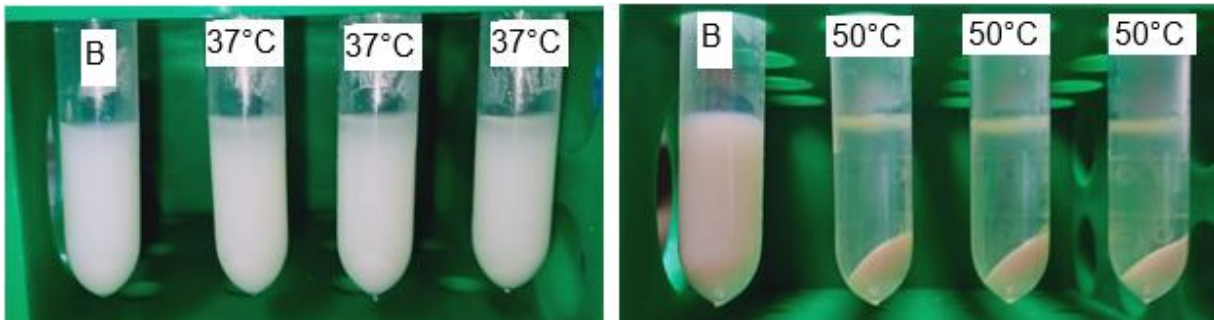
Fonte: Autor 2022

5.11 Efeito da temperatura no processo de coagulação do leite

O extrato bruto foi submetido a temperaturas de 37 e 50 °C (Figura 21) a fim de avaliar qual a melhor temperatura para a coagulação do leite. A maior atividade de coagulação do EB foi apresentada quando a temperatura foi aumentada para 50 °C o que reduziu o tempo de coagulação e aumentou sua atividade coagulante para 66,7 UAC/mL.

Um resultado semelhante foi obtido por Soares et al (2015) eles relataram uma enzima obtida do látex da fruta pão (*Artocarpus altilis*) que apresentou uma taxa de processabilidade do leite quando incubada a 50°C.

Figure 21: Efeito da temperatura na atividade hidrolítica do EB das sementes da *Salvia hispânica L.*

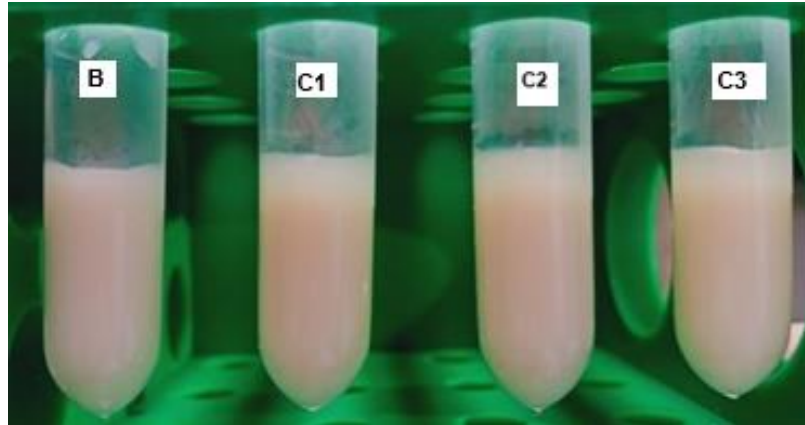


Fonte: Autor.,2022

5.12 Efeito da estabilidade térmica na coagulação do leite desnatado

Após aquecimento a 100 °C, a atividade coagulante do EB foi completamente extinguida (figura 22), sendo demonstrado através do ensaio enzimático que o aumento da temperatura para 100 °C ocasionou a perda da atividade devido a desnaturação da enzima que faz com que ocorra uma modificação da estrutura tridimensional. Isso confirma que o princípio ativo da atividade coagulante é a presença da(s) enzima(s) nativas(s) presentes no extrato.

Figure 22: Efeito da temperatura 100 °C (B) Controle, (C1) (C2) e (C3) correspondem as triplicatas



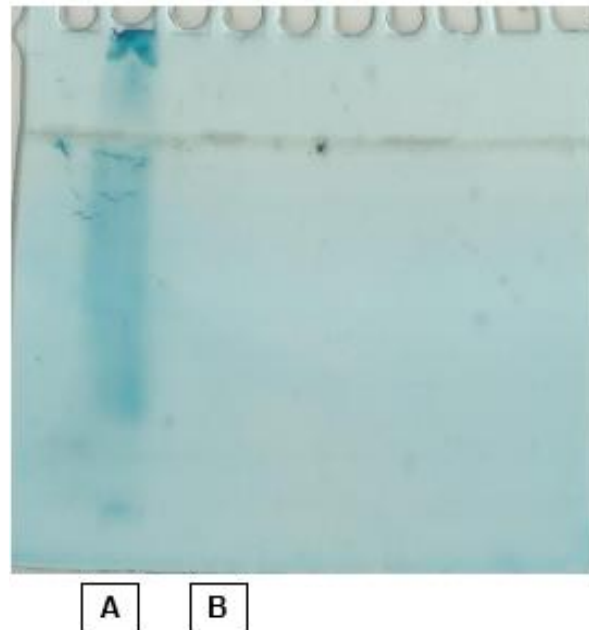
Fonte: Autor,2022

Soares et al (2015) demonstraram um resultado semelhante, corroborando com o resultado observado, onde o extrato da *Artocarpus altilis* apresentou redução da atividade à medida que ocorreu o aumento da temperatura ($>80^{\circ}\text{C}$). Extratos das sementes de noni (*Morinda citrifolia*) em temperaturas mais altas ($>70^{\circ}\text{C}$), também tiveram sua atividade coagulante reduzida, indicando desnaturação da enzima (Oliveira et al.,2021).

5.13 verificação da hidrólise de caseína por eletroforese e dosagem de proteínas solúveis

A coagulação do leite foi avaliada através do perfil de proteínas expressos em gel poliacrilamida (figura 23).

Figure 23: Verificação da atividade coagulante por meio de eletroforese SDS-PAGE do soro do leite: Canaleta A- perfil de proteínas do soro antes da coagulação, B- soro do leite após a coagulação completa do leite

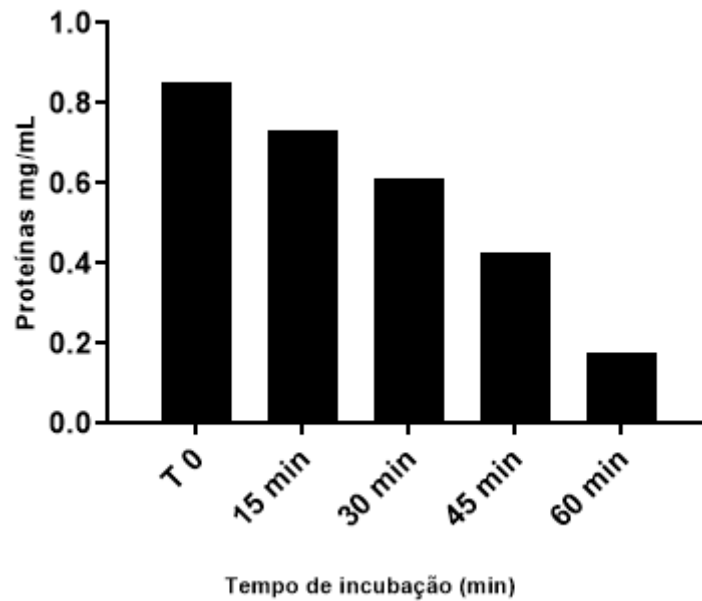


Fonte: Autor,2023

O resultado obtido nos mostra que no $T=0$ da coagulação, temos um maior conteúdo proteico, sendo possível observar a maior intensidade na coloração da canaleta, e à medida que ocorre a coagulação temos uma diminuição desse conteúdo proteico no soro do leite devido a precipitação da caseína, como observado na canaleta B, o que mostra que a protease foi eficaz no processo de coagulação do leite.

A fim de confirmar o resultado observado no SDS-PAGE foi realizado a dosagem de proteínas presentes no soro do leite ao longo do processo da coagulação como pode ser visto na imagem 24.

Figure 24: Verificação da atividade coagulante por meio da quantificação de proteínas presentes no soro de leite em diferentes tempos



Fonte: Autor,2023

O resultado obtido na dosagem de proteínas utilizando o método de Bradford corrobora com o perfil observado no gel de poliacrilamida, indicando assim que o EB da *Salvia hispânica L.* foi eficaz no processo de coagulação.

6.0 Conclusão

- O extrato bruto das sementes da *Salvia hispânica L* apresentou atividade proteolítica;
- Apresentou temperatura ótima de 70°C e pH ótimo de 4,0 utilizando o substrato azocaseína;
- A atividade proteolítica aumentou na presença dos íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+
- A atividade proteolítica do EB foi inibida por benzamidina, PMSF e DTT respectivamente;
- A amostra apresentou uma elevada atividade coagulante do leite bovino quando comparada a outros EB com atividade coagulante;
- A atividade coagulante do EB foi mais eficiente quando aquecido a 50°C;

Referências

- Andrén, A. Cheese: Rennets and Coagulants. In J. W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd ed., (pp. 574-578). London: Elsevier Academic Press, 2011
- Ahmed IAM, Babiker EE, Mori N (2010) 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* 43:759–764
- ANTÃO, Cecília M.; MALCATA, F. Xavier. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 43, n. 7, p. 637-650, 2005.
- Asakura, T.; Watanabe, H.; Abe, K.; Arai, S. Oryzasin as an Aspartic Proteinase Occurring in Rice Seeds: Purification, Characterization, and Application to Milk Clotting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997, 45, 1070–1075
- ASIF-ULLAH, Mufti; KIM, Key-Sun; YU, Yeon Gyu. Purification and characterization of a serine protease from *Cucumis trigonus* Roxburghi. *Phytochemistry*, v. 67, n. 9, p. 870-875, 2006.
- Barros RM, Extremina CI, Goncalves IC, Braga BO, Balcao VM, Malcata FX (2003) Hydrolysis of alpha-lactalbumin by cardosin A immobilized on highly activated supports. *Enzyme Microb Technol* 33:908–916
- BEN AMIRA, Amal et al. Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. *International Journal of Food Properties*, v. 20, n. sup1, p. S76-S93, 2017.
- BEUX, Simone. Avaliação das propriedades de coagulação de leite bovino in natura por parâmetros latodinamográficos e reológicos.
- Bomfim, N. da S., & Kanashiro, A. D. dos S. (2016). PROPRIEDADES NUTRICIONAIS DA SALVIA HISPANICA L. E SEUS BENEFÍCOS PARA A SAÚDE HUMANA. *Unoesc & Ciência - ACBS*, 7(2), 199–206
- BUTTLE, David J.; MORT, John S. Cysteine proteases. 2013.
- CARVALHO, GR, D. T. da ROCHA, and IR GOMES. "O mercado de leite em 2017." (2018).

COELHO, Michele Silveira; SALAS-MELLADO, Myriam de Las Mercedes. Chemical composition, functional properties and technological applications of chia (*Salvia hispanica* L) seeds in foods. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 17, p. 259-268, 2014.

Chan, Guillermo Arturo Herrera, et al. "AdubaÃ§Ã£o nitrogenada em plantas medicinais de *Salvia hispanica* L.(chia) em Gurupi, Tocantins, Brasil." *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 25.1 (2020).

Costa, A. A., et al. "Osmoprotection in *Salvia hispanica* L. seeds under water stress attenuators." *Brazilian Journal of Biology* 82 (2021).

Egito, A.; Girardet, J.-M.; Laguna, L.; Poirson, C.; Molle, D.; Miclo, L.; Humbert, G.; Gaillard, J.-L. MilkClotting Activity of Enzyme Extracts from Sunflower and Albizia Seeds and Specific Hydrolysis of Bovine KCasein. *International Dairy Journal* 2007, 17, 816–82

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. *European Food Research and Technology* 2012, 234, 527–533.

FERNANDES, Joana. *Produção de queijo: origem dos coalhos*. 2013.

GROZDANOVIC, Milica M.; BURAZER, Lidija; GAVROVIC-JANKULOVIC, Marija. Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) extract shows potential as a low-cost and efficient milk-clotting agent. *International Dairy Journal*, v. 32, n. 1, p. 46-52, 2013.

GRUDKOWSKA, Małgorzata; ZAGDAŃSKA, Barbara. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*, v. 51, n. 3, p. 609-624, 2004.

GRZONKA, Zbigniew; KASPRZYKOWSKI, Franciszek; WICZK, Wiesław. Cysteine proteases. In: *Industrial enzymes*. Springer, Dordrecht, 2007. p. 181-195.

GUIAMA, V. D. et al. Milk-clotting potential of fruit extracts from *Solanum esculentum*, *Solanum macrocarpon* L. and *Solanum melongena*. *African Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 12, 2010.

HACHANA, Yasser; ALOUI, Oussama; FORTINA, Riccardo. Use of caprifig tree extract as a substitute for calf rennet in goat's fresh cheese production. *Small Ruminant Research*, v. 199, p. 106382, 2021.

JACOB, Mandy; JAROS, Doris; ROHM, Harald. Recent advances in milk clotting enzymes. *International journal of dairy technology*, v. 64, n. 1, p. 14-33, 2011.

KUMAR, A. et al. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical reviews in biotechnology*, v. 30, n. 4, p. 243-258, 2010.

LAGUNA, Luis Eduardo; DO EGITO, A. S. Atividade coagulante de extratos vegetais no leite integral de caprino e bovino. 2001.

Liburdi, Katia, et al. "An evaluation of the clotting properties of three plant rennets in the milks of different animal species." *Foods* 8.12 (2019): 600.

Low, Y.H.; Agboola, S.; Zhao, J.; Lim, M.Y. Clotting and proteolytic properties of plant coagulants in regular and ultrafiltered bovine skim milk. *Int. Dairy J.* **2006**, 16, 335–343

Mamo, Jermen; Assefa, Fassil (2018). *The Role of Microbial Aspartic Protease Enzyme in Food and Beverage Industries. Journal of Food Quality*, 2018(), 1–15.

MENDES, M. H. A. F. Produção higiênica do leite: boas práticas agrícolas. Pós-graduação em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Castelo Branco, Brasília, 2006.

MIGLIAVACCA, R. A. et al. O cultivo da chia no Brasil: futuro e perspectivas. *Journal of Agronomic sciences*, v. 3, n. 1, p. 161-179, 2014.

Mohanty, A. K., et al. "Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture." *Biotechnology Advances* 17.2-3 (1999): 205-217.

Muniz, Ludmila Correa, Samanta Winck Madruga, and Cora Luiza Araújo. "Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil: um estudo de base populacional." *Ciência & Saúde Coletiva* 18 (2013): 3515-3522.

NITU, Sorin; GEICU-CRISTEA, Mihaela; MATEI, Florentina. Milk-Clotting Enzymes Obtained from Plants in Cheesemaking—A Review. *Sci. Bull. Ser. F Biotechnol*, v. 25, p. 66-75, 2021.

Norlaily Mohd Ali, Swee Keong Yeap, Wan Yong Ho, Boon Kee Beh, Sheau Wei Tan, Soon Guan Tan, "The Promising Future of Chia, *Salvia hispanica* L.", *BioMed Research International*, vol. 2012, Article ID 171956, 9 páginas, 2012.

Nicosia, Fabrizio Domenico, et al. "Plant milk-clotting enzymes for cheesemaking." *Foods* 11.6 (2022).

OLIVEIRA, Anne Caroline Defrancesci et al. Comparação entre três bioprocessos para a produção de enzimas proteolíticas utilizando resíduos agroindustriais. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 6, n. 2, 2012.

Oliveira, J. D. de, & Siqueira Junior, C. L. (2022). A new milk-clotting enzyme from noni seeds (*Morinda citrifolia* L). In *SciELO Preprints*. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-56/2021>

Ordóñez, J. A., et al. "Características gerais do leite e componentes fundamentais." *Tecnologia de Alimentos* 2 (2005): 13-37.

PHADUNGATH, Chanokphat. The mechanism and properties of acid-coagulated milk gels. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, v. 27, n. 2, p. 433-448, 2005.

Paiva, Emanoela Pereira de, et al. "Germination and biochemical components of *Salvia hispanica* L. seeds at different salinity levels and temperatures." *Acta Scientiarum. Agronomy* 40 (2018)

ROSEIRO, Luisa Bivar et al. Cheesemaking with vegetable coagulants—the use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, v. 56, n. 2, p. 76-85, 2003.

Sarmiento, A.C.; Lopes, H.; Oliveira, C.S.; Vitorino, R.; Samyn, B.; Sergeant, K.; Debyser, G.; Van Beeumen, J.; Domingues, P.; Amado, F. Multiplicity of Aspartic Proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta* 2009, 230, 429–439

SCOTT, R.; ROBINSON, R. K.; WILBEY, R. A. Cheesemaking practice 3rd edn. Springer Science+ Business Media. New York, USA, v. 2, p. 345-49, 1998.

Shah, M.A., Mir, S.A. & Paray, M.A. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Sci. & Technol.* 94, 5–16 (2014).

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

SHINDO, Takayuki; VAN DER HOORN, Renier AL. Papain-like cysteine proteases: key players at molecular battlefields employed by both plants and their invaders. *Molecular plant pathology*, v. 9, n. 1, p. 119-125, 2008.

SIQUEIRA, Kennya B. O mercado consumidor de leite e derivados. *Circular Técnica Embrapa*, v. 120, p. 1-17, 2019.

SOARES, Elisângela França et al. Potencial do latex da fruta pão (*Artocarpus altilis*) como agente coagulante do leite. *Ciência Rural*, v. 45, p. 149-154, 2015.

Tripathi, P.; Tomar, R.; Jagannadham, M.V. Purification and Biochemical Characterisation of a Novel Protease Streblin. *Food Chemistry* 2011, 125, 1005–1012.

TROCH, Thibault et al. Cow milk coagulation: process description, variation factors and evaluation methodologies. A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, v. 21, 2017.

Uchikoba, T.; Kaneda, M. Milk-Clotting Activity of Cucumisin, a Plant Serine Protease from Melon Fruit. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1996, 56, 325–330.

Uchikoba, T.; Kaneda, M. Milk-Clotting Activity of Cucumisin, a Plant Serine Protease from Melon Fruit. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1996, 56, 325–330

Valdivia-López, M. Ángeles (2015). *[Advances in Food and Nutrition Research] || Chia (Salvia hispanica): A Review of Native Mexican Seed and Its Nutritional and Functional Properties.* , (), -. doi:10.1016/bs.afnr.2015.06.002

VASCONCELOS, Mariana; ARAUJO, Kátia; VERRUMA-BERNARDI, Marta. Efeito do pH de coagulação do leite e do tipo de coalho sobre o rendimento de massa na produção de queijo. *Current Agricultural Science and Technology*, v. 10, n. 4, 2004.

VERMA, Sonia; DIXIT, Rajnikant; PANDEY, Kailash C. Cysteine proteases: modes of activation and future prospects as pharmacological targets. *Frontiers in pharmacology*, v. 7, p. 107, 2016.

VERMELHO, Alane Beatriz et al. Enzimas proteolíticas: Aplicações biotecnológicas. *Enzimas em biotecnologia-Produção, aplicações e mercado*, p. 273-287, 2008.

MACHADO, Marília Helena Fernandes. *Produção de coalho líquido de cardo para aplicação industrial*. 2013. Tese de Doutorado

PRADO, Fabiano Brito et al. Viabilidade da produção de proteases por espécies de *Aspergillaceae* e triagem de coagulantes do leite bovino. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 2, p. 16356-16373, 2021

BIJLA, E.; HOLLAND, J. W.; BOLAND, M. Posttranslational modifications of caseins. *In: BOLAND, M.; SINGH, H. (Org.). Milk proteins from expression to food*. [S.l.]: Elsevier, 2016, p. 176–211.

DALGLEISH, D G; HORNE, D S; LAW, A. J. R. Size-related differences in bovine casein micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1989. v. 991, n. 3, p. 383–387. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304416589900615>>.

DALGLEISH, Douglas G. On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. *Soft Matter*, 2011. v. 7, n. 6, p. 2265–2272. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C0SM00806K>>.

PARKER, T. G. Binding of calcium ions to bovine α s₁-casein and precipitability of the protein–calcium ion complexes. *Journal of Dairy Research*, 1980. v. 47, n. 1, p. 113–122.

SPAGNUOLO, P. A.; DOUGLAS GOFF, H. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, 2004. v. 14, n. 12, p. 1025–1031. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694604001037>>.

DONNELLY, W. J. *et al.* A comprehensive study of the relationship between size and protein composition in natural bovine casein micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1984. v. 789, n. 2, p. 136–143. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167483884901973>>.

FÉLIX H. D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. [S.l.]: [s.n.], p. 5–21, 2001.

GOULDING, D. A.; FOX, P. F.; MAHONY, J. A. O. Milk proteins: An overview. *In*: BOLAND, M.; SINGH, H. (Org.). Milk proteins from expression to food. [S.l.]: Elsevier, 2020, p. 21–98.

HOLT, Carl; DALGLEISH, Douglas G. Electrophoretic and hydrodynamic properties of bovine casein micelles interpreted in terms of particles with an outer hairy layer. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1986. v. 114, n. 2, p. 513–524. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021979786904376>>.

JENNESS, R. Calculation of the ion equilibria in milk diffusate and comparison with experiment. *Analytical Biochemistry*, 1981. v. 113, n. 1, p. 154–163. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269781900592>>.

HORNE, David S. Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2006. v. 11, n. 2, p. 148–153. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359029405001196>>.

KRUIF, C. G. DE; HOLT, C. Casein Micelle Structure, Functions and Interactions. *In*: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Org.). *Advanced Dairy Chemistry---1 Proteins: Part A / Part B*. Boston, MA: Springer US, 2003, p. 233–276.

OUANEZAR, M.; GUYOMARC'H, F.; BOUCHOUX, A. AFM Imaging of Milk Casein Micelles: Evidence for Structural Rearrangement upon Acidification. *Langmuir*, 20 mar. 2012. v. 28, n. 11, p. 4915–4919. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/la3001448>>.

PARKER, T. G.; DALGLEISH, Douglas G. Binding of calcium ions to bovine β -casein. *Journal of Dairy Research*, 1981. v. 48, n. 1, p. 71–76.

PONCE, P. Ceballo. Composição do leite: uma perspectiva desde o trópico. *In*: REGINA, C. S. (Org.). *Qualidade do leite bovino: variações no trópico e no subtropico*. [S.l.]: UPF editora, 2001, V. 1999, p. 28–53.

QI, P. X. *et al.* Studies of casein micelle structure : the past and the present To cite this version : HAL Id : hal-00895656 Studies of casein micelle structure : 2007.

SAITO, T.; ITOH, T. Linked Sugar Chains in Bovine K-Casein. *Journal of Dairy Science*, 1992. v. 75, n. 7, p. 1768–1774. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77936-3](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77936-3)>.

SILVA, N. N. *et al.* Micelas de caseína: dos monômeros à estrutura supramolecular. *Brazilian Journal of Food Technology*, 2019. v. 22, p. 1–15.

SWAISGOOD, H. E. Chemistry of the Caseins. *In*: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Org.). *Advanced Dairy Chemistry---1 Proteins: Part A / Part B*. Boston, MA: Springer US, 2003, p. 139–201.

TRAN, V. D.; BAKER, B. E. Casein . IX . Carbohydrate Moiety of k-Casein. *Journal of Dairy Science*, [s.d.]. v. 53, n. 8, p. 1009–1012. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(70\)86336-6](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(70)86336-6)>.

VREEMAN, H. J. *et al.* Characterization of bovine κ -casein fractions and the kinetics of chymosin-induced macropeptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-containing fractions determined by high-performance gel-permeation chromatography. *Biochemical Journal*, 1986. v. 240, n. 1, p. 87–97. Disponível em: <<https://doi.org/10.1042/bj2400087>>.

Walter, C., et al. "Milk and health." *N. Engl. J. Med* 382 (2020): 644-654.

Dupont, D., and D. Tomé. "Milk Proteins." (2020): 701-714.

Fox, P. F., et al. "Heat-induced changes in milk." *Dairy chemistry and biochemistry* (2015): 345-375.

Santos, Patricia Menezes, Milena Provazi, and Gilberto Batista de Souza. "Determinação de atividade de proteases em *Panicum maximim* cv. Tanzania." (2005).

SOUZA, Paula Monteiro et al. Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado brasileiro. *Microbiologia in Foco*, p. 17-23, (2012)

Beka, Robert G., et al. "Characterisation of a milk-clotting extract from *Balanites aegyptiaca* fruit pulp." *International Dairy Journal* 34.1 (2014): 25-31.

Franco Denti, A., Chies Polina, C., Vanz, J., Lisboa Bernardi, J., Martini Becker, L., Schenatto Palavicini, S. M., Feiden, T., & Backes, G. T. (2022). Enzimas e suas

aplicações com ênfase na indústria de alimentos. *Revista Perspectiva*, 46(175), 51-68.

Freitas, Cleverson Diniz T., et al. "Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*." *Plant Physiology and Biochemistry* 45.10-11 (2007): 781-789.

Vallés, Diego, and Ana MB Cantera. "Antiacthain A: new proteases isolated from *Bromelia antiacantha* Bertol.(Bromeliaceae)." *International journal of biological macromolecules* 113 (2018): 916-923.

Ahmed, Isam Ali Mohamed, et al. "Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds." *Food chemistry* 116.2 (2009): 395-400.

França-Santos, A., Alves, R. S., Leite, N. S., & Fernandes, R. P. M. (2011). Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi). *Scientia Plena*, 5(11)

Cao, Yuanyuan, and Yapei Wang. "Temperature-Mediated Regulation of Enzymatic Activity." *ChemCatChem* 8.17 (2016): 2740-2747.

Daniel, Roy M., et al. "The effect of temperature on enzyme activity: new insights and their implications." *Extremophiles* 12 (2008): 51-59.

Amid, Mehrnoush, Mohd Yazid ABD Manap, and Nor Khanani Zohdi. "Purification and characterization of alkaline-thermostable protease enzyme from pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) waste: a potential low cost of the enzyme." *BioMed research international* 2014 (2014).

Gomes, Eleni, et al. "Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial." *Química nova* 30 (2007): 136-145.

Grzonka, Zbigniew, et al. "Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors." *Acta Biochimica Polonica* 48.1 (2001): 1-20.

Afsharnezhad, Moslem, S. Shirin Shahangian, and Reyhaneh Sariri. "A novel milk-clotting cysteine protease from *Ficus johannis*: Purification and characterization." *International Journal of Biological Macromolecules* 121 (2019): 173-182.

Lehninger, A. L., D. L. Nelson, and M. M. Cox. "Lehninger principles of biochemistry. 4th ed2005."

Mazorra-Manzano, Miguel Angel, et al. "Sour orange *Citrus aurantium* L. flowers: a new vegetable source of milk-clotting proteases." *LWT-Food Science and Technology* 54.2 (2013): 325-330.

Naveed, Muhammad, et al. "Protease—a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review." *Catalysis Letters* 151 (2021): 307-323.

Punekar, N. S. *Enzymes: catalysis, kinetics and mechanisms*. Springer, 2018.

PACHECO, TF, and TD MENDES. "Guia prático para caracterização de enzimas." (2021).

Pontual, Emmanuel V., et al. "Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers." *Food chemistry* 135.3 (2012): 1848-1854.

Vairo-Cavalli, S.; Claver, S.; Priolo, N.; Natalucci, C. Extraction and Partial Characterization of a Coagulant Preparation from *Silybum marianum* Flowers. Its Action on Bovine Caseinate. *J. Dairy Res.* 2005, 72, 271–275

Anusha, R., Maheshwari Kumari Singh, and O. S. Bindhu. "Characterisation of potential milk coagulants from *Calotropis gigantea* plant parts and their hydrolytic pattern of bovine casein." *European Food Research and Technology* 238 (2014): 997-1006.

Moreno-Hernández, J.M.; Hernández-Mancillas, X.D.; Navarrete, E.L.C.; Mazorra-Manzano, M.Á.; Osuna-Ruiz, I.; Rodríguez-Tirado, V.A.; Salazar-Leyva, J.A. Partial Characterization of the Proteolytic Properties of an Enzymatic Extract From "Aguama" *Bromelia pinguin* L. Fruit Grown in Mexico. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2017, 182, 181–196.

Afsharnejhad, M.; Shahangian, S.S.; Sariri, R. A Novel Milk-Clotting Cysteine Protease from *Ficus johannis*: Purification and Characterization. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019, 121, 173–182

González-Velázquez, D.A.; Mazorra-Manzano, M.A.; Martínez-Porchas, M.; Huerta-Ocampo, J.A.; Vallejo-Córdoba, B.; Mora-Cortes, W.G.; Moreno-Hernández, J.M.;

Ramírez-Suarez, J.C. Exploring the Milk-Clotting and Proteolytic Activities in Different Tissues of *Vallesia glabra*: A New Source of Plant Proteolytic Enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2021, 193, 389–404

SIQUEIRA, K. B. Consumo de Leite e Derivados no Brasil. Anuário Leite Embrapa, Juiz de Fora – MG, 2019. p. 24-25. Available at: . Accessed on: Feb 15 2020

Willett, Walter C., and David S. Ludwig. "Milk and health." *New England Journal of Medicine* 382.7 (2020): 644-654.

Goulding, D. A., P. F. Fox, and J. A. O'Mahony. "Milk proteins: An overview." *Milk proteins* (2020): 21-98.

Romero-Velarde, Enrique, et al. "The importance of lactose in the human diet: Outcomes of a Mexican consensus meeting." *Nutrients* 11.11 (2019): 2737.

Perrone, Ítalo Tuler, João Pablo Fortes Pereira, and Antônio Fernandes de Carvalho. "Aspectos tecnológicos da fabricação de soro em pó: uma revisão." *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes* 66.380 (2011): 23-30.

Oliveira, D., and J. A. O'Mahony. "Composition, Fractionation, Techno-Functional Properties and Applications of Milk Fat Globule Membrane–Derived Material." *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids* (2020): 169-195.

Nörnberg, Marcele L., et al. "Compostos bioativos em manteigas: carotenoides e ácidos graxos Bioactive compounds in butters: carotenoids and fatty acids." *Brazilian Journal of Development* 8.2 (2022): 10270-10288.

Boland, Mike, and Harjinder Singh, eds. *Milk proteins: from expression to food*. Academic Press, 2019.

Silva, Naaman Nogueira, et al. "Micelas de caseína: dos monômeros à estrutura supramolecular." *Brazilian Journal of Food Technology* 22 (2019).

Mehta, B. M. (2015). *Chemical Composition of Milk and Milk Products. Handbook of Food Chemistry*, 511–553. doi:10.1007/978-3-642-36605-5_31

De Faria, Paulo. (2016). OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS ASSIMÉTRICAS COM PELE DENSA À BASE DE POLIACRILONITRILA. 10.13140/RG.2.2.15884.31367.

ORDOÑEZ, J.A. *Tecnologia de Alimentos* Vol. 2. 1ª Ed. Editora Artmed, 2005

Walter, C., et al. "Milk and health." *N. Engl. J. Med* 382 (2020): 644-654.

Gaucheron, Frédéric. "The minerals of milk." *Reproduction Nutrition Development* 45.4 (2005): 473-483.

De Paula JCJ, Carvalho AF, Furtado MM. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga [Basic principles of cheese production: from historical to salting]. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes* [Internet]. 2009; 64(367):19-25.

Porfirio, Poliana Alves, et al. "Elaboração de Queijo Artesanal Através da Coagulação Ácida do Leite." *International Journal of Nutrology* 11.S 01 (2018): Trab365.

Justina, Marciel Dela, Mariléia Buss Dela Justina, and Everton Skoronski. "O uso das enzimas na indústria de laticínios: uma breve revisão." *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes* 73.3 (2018): 172-184.

Lucey, J.A. (2016). Coagulação ácida do leite. In: McSweeney, P., O'Mahony, J. (eds) *Química Avançada de Laticínios*. Springer, Nova Iorque, NY.

Nitu, Sorin, Mihaela Geicu-Cristea, and Florentina Matei. "Milk-clotting enzymes obtained from plants in cheesemaking—A review." *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies* 25 (2021): 66-75.

Sodero, Ana CR, Salvatore G. De Simone, and Floriano P. Silva-Jr. "Mecanismo catalítico e estado de protonação do sítio ativo de aspartil proteases pepsina-símiles." *Revista Virtual de Química* 1.2 (2009): 128-137.

Muri, Estela Maris Freitas. "Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptidomiméticos." *Química Nova* 37 (2014): 308-316.