



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR

JOSIEL SANTOS DO NASCIMENTO

SERINO PROTEASE DAS SEMENTES DA PLANTA *Leucaena*
leucocephala: CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

Maceió

2024

JOSIEL SANTOS DO NASCIMENTO

SERINO PROTEASE DAS SEMETES DA PLANTA *Leucaena
leucocephala*: CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos parciais para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo.

Maceió

2024

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4

N244s

Nascimento, Josiel Santos do.

Serino protease das sementes da planta *Leucaena leucocephala* :
caracterização e aplicação biotecnológica / Josiel Santos do Nascimento. – 2024.
115 f. : il. color., grafs., tabs.

Orientador: Luciano Aparecido Meireles Grillo.

Tese (doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal
de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2024.

Bibliografia: f. 97-115.

1. *Leucaena leucocephala* - Caracterização. 2. Coagulantes. 3. Enzimas
proteolíticas. I. Título.

CDU: 606:58



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E



Ata de defesa de Tese de Doutorado

Aos vinte e quatro dias do mês de abril de 2024, às 8h:30min, reuniu-se, via videoconferência, através do link: a banca examinadora composta pelos docentes doutores, Francis Soares Gomes, Johnnatan Duarte de Freitas e Ticiano Gomes do Nascimento, para a **Defesa da tese de doutorado** intitulada: “**Serino protease de planta: caracterização e aplicação biotecnológica**” elaborada pelo doutorando **Josiel Santos do Nascimento**, regularmente matriculado no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, doutorado, sob a orientação do **Prof. Luciano Aparecido Meireles Grillo**, que presidiu os trabalhos. Em seguida, reunidos em sessão secreta às horas, os examinadores consideram a tese **(X) APROVADO OU () APROVADA COM RESTRIÇÃO**, emitindo o seguinte parecer: aprovado mediante alterações sugeridas pela banca.

Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às 11:30 horas e eu, Daniel de Brito Ricarte, Secretário do PMBqBM, Curso de Doutorado, lavrei a presente ata que segue assinada pela banca examinadora e pelo doutorando.

Maceió, 24 de abril de 2024

Presidente (Orientador): Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo

Documento assinado digitalmente
gov.br LUCIANO APARECIDO MEIRELES GRILLO
Data: 25/04/2024 14:23:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador interno: Prof. Dr Francis Soares

Documento assinado digitalmente
gov.br FRANCIS SOARES GOMES
Data: 25/04/2024 16:18:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador interno: Prof. Dr Hugo Juarez Vieira Pereira

Documento assinado digitalmente
gov.br HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA
Data: 26/05/2025 13:25:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador externo: Prof. Dr. Johnnatan Duarte De Freitas

Documento assinado digitalmente
gov.br JOHNNATAN DUARTE DE FREITAS
Data: 24/05/2024 14:19:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador externo: Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento

Documento assinado digitalmente
gov.br TICIANO GOMES DO NASCIMENTO
Data: 07/05/2024 09:00:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Doutorando: Josiel Santos do Nascimento

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSIEL SANTOS DO NASCIMENTO
Data: 27/04/2024 19:01:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus pelas coisas maravilhosas em minha vida e, por sempre ter estendido as mãos nos momentos mais difíceis.

A minha família que sempre estiveram tocado por mim e vimbrando com minhas conquistas; especialmente minha mãe, Maria José pela sua sabedoria e força de caráter, de quem desde a minha tenra infância tem ensinando-me a ser uma pessoa melhor todos dias.

Ao professor e amigo Luciano Grillo pelo convite e confiança em mim para fazer parter da sua equipe de pesquisa, por seus conselhos, orientação, paciência e puxões de orelhas nos momentos oportunos, sempre visando o melhor caminho para gente seguir.

Obrigado ao Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos – LBFI pelo suporte no desenvolvimento deste trabalho. Aos amigos de longa jornada como: Camilla Carmerindo, Mariana, Meyrielle, Antonio Thomas, Robert, Lays, João Carlos, Larissa, Tayse, Valéria, Luana, Erika e, também aos novos amigos: João, Julia, Camila, Erica Caroline, Alvaro Arthur; pessoas com tive a oportunidade de dividir diversos momentos importantes da minha vida profissional, senjam de trabalho, aprendizado e resiliência. Assim como os recém chegados Nicholas e Maria Eduarda, pessoas inteligentes e determinadas que passaram a fazer parte deste ambiente pluralidade de pessoas e formações acadêmicas, realização de sonhos e conhecimentos.

Obrigado ao Laboratório de Metabolismo e Proteômica – LAMP, por também ter disponibilizado ferramentas no desenvolvimento deste trabalho e, pelo acolhimento das pessoas maravilhosas que compõem o seu quadro de trabalho. Aos professores Hugo Juarez e Frances Gomes pelos seus conselhos, conhecimentos e trocas de experiência. Aos amigos formado nesse laboratório como Elizabete, Humberto que ajudaram no desenvolvimento do meu trabalho de mestrado ao Cláudio que foi uma pessoa importante no desenvolvimeto do meu trabalho de doutorado. Assim como, Monize, Alessandra, Davida, Ricardo, Fabiana, Stella, Keilane, Marta Angelo, Marta Maria, Heloisa, Gessica, Tatiele e Andreia; obrigado a todos pelos momentos de amizade, companherimos, gentilezas e incentivos nos momentos mais difíceis da carreira que escolhemos.

Ao Cledson um amigo especial que conheci no início da graduação, uma enciclopédia ambulante de conhecimentos: acadêmicos, científicos, pop, histórico... em que tive diversas conversas prezerosas sobre o mundo que vivemos, um abraço meu amigo.

A professora Samia que contribuiu bastante para meu trabalho com seus conhecimentos e conselhos pertinentes sobre plantas, no momento que deixei de trabalhar com insetos e partir para uma nova área de pesquisa para mim.

Ao professor Ticiano por sua inteligência, conselhos e bom humor; pela confiança de disponibilizar seu laboratório para que pudesse realizar os experimentos necessários para minha pesquisa. Assim também como os seus alunos pela disponibilidade, amizade e acolhimento no seu espaço de trabalho.

Resumo

A aplicação de enzimas nos processos biotecnológicos, possibilita uma significativa redução de custos com consequente diminuição do consumo energético. Neste contexto, as proteases são as biomoléculas mais produzidas e, representam 60 % de todas as enzimas comercializadas no mundo. A importância do uso destas moléculas se deve a fatores como elevada atividade catalítica, seletividade, especificidade, assim como a variabilidade de produção. Diante da demanda de produzir estudos voltados a obtenção de enzimas com viés industrial, objetivamos a obtenção e caracterização de protease de interesse biotecnológico proveniente das sementes de *Leucaena leucocephala*. Portanto, foram preparado extrato enzimático das sementes da *L. leucocephala* em tampão Tris-HCl, 50 mM em pH 8,0 e, posteriormente, foram realizados ensaios de pH, temperatura, inibição, efeitos dos diferentes substratos, íons metálicos, solventes orgânicos e detergentes na atividade enzimática. As atividades ótimas da enzima foram determinadas em 40° C e pH 9,0. Em testes de estabilidades, a enzima se manteve estável em uma ampla faixa de pH (5,0 a 9,0) e temperaturas (40° C a 60° C). Além disso, a enzima teve a sua atividade catalítica melhorada na presença de íons metálicos (Na⁺, K⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺). Além disso, a enzima demonstrou estabilidade e compatibilidade com detergentes e solventes orgânicos. O que evidencia o potencial biotecnológico dessa enzima em vários processos industriais. Quando o extrato enzimático foi submetido a diferentes substratos cromogênicos conjugados com *p*-nitroanilina, a hidrólise mostrou especificidade para o BApNA. Além disso, a atividade enzimática foi inibida por PMSF (95,80 %) seguido por Benzamidina (84,22 %). Portanto, a enzima pertence à classe das serino proteases. Em teste de senescência, a enzima demonstrou atividade enzimática mais expressiva no final do desenvolvimento das sementes. Em relação a aplicação biotecnológica, a enzima exibiu atividade coagulante de leite 13 Um/mL, no leite em pó, e essa atividade foi mais eficiente no leite integral pasteurizado 83 Um/mL, a temperatura de 50° C. O perfil proteico referente a atividade proteolítica no leite em pó desnatado foram analisado em gel de Poliacrilamida SDS-PAGE. E de acordo com o resultado foi possível observar uma diminuição no perfil protéico do leite em função do aumento do tempo de incubação. Este resultado também foi demonstrado por dosagem de proteínas reiduais, por reação de Bradford, onde observamos que ambos os experimentos corroboram para o pressuposto de que a enzima vegetal proporciona hidrólise das proteínas do leite. O extrato aquoso das sementes da *L. leucocephala* foi submetido a teste de toxicidade através de bioindicador. Foi possível evidenciar que não foi gerado ambiente tóxico após a exposição por 24 horas dos crustáceos, *Artemia salina*, a diferentes concentrações do extrato aquoso. Por meio desta pesquisa, foi possível descrever um novo coagulante de leite. Além disso, a enzima demonstrou estabilidade a presença de detergentes e solventes orgânicos demonstrando o potencial uso dessa enzima na produção industrial de detergentes e peptídios bioativos, respectivamente.

Palavras – chaves: *L. leucocephala*, coagulante, caracterização, atividade proteolítica

Abstract

The application of enzymes in biotechnological processes allows for a significant reduction in costs with a consequent reduction in energy consumption. In this context, proteases are the most produced biomolecules and represent 60 % of all enzymes sold in the world. The importance of using these molecules is due to factors such as high catalytic activity, selectivity, specificity, as well as production variability. Given the demand to produce studies aimed at obtaining enzymes with an industrial bias, we aimed to obtain and characterize a protease of biotechnological interest from the seeds of *Leucaena leucocephala*. Therefore, enzymatic extract from *L. leucocephala* seeds was prepared in Tris-HCl buffer, 50 mM at pH 8.0 and, subsequently, tests were carried out on pH, temperature, inhibition, effects of different substrates, metal ions, organic solvents and detergents on the activity enzymatic. The optimal enzyme activities were determined at 40° C and pH 9.0. In stability tests, the enzyme remained stable over a wide range of pH (5.0 to 9.0) and temperatures (40° C to 60° C). Furthermore, the enzyme's catalytic activity improved in the presence of metal ions (Na^+ , K^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} and Ca^{2+}). Furthermore, the enzyme has demonstrated stability and compatibility with detergents and organic solvents. This highlights the biotechnological potential of this enzyme in various industrial processes. When the enzyme extract was subjected to different chromogenic substrates conjugated with p-nitroaniline, the hydrolysis showed specificity for BApNA. Furthermore, enzyme activity was inhibited by PMSF (95.80 %) followed by Benzamidine (84.22 %). Therefore, the enzyme belongs to the class of serine proteases. In a senescence test, the enzyme demonstrated more significant enzymatic activity at the end of seed development. In relation to biotechnological application, the enzyme exhibited milk coagulating activity 13 Um/mL, in powdered milk, and this activity was more efficient in pasteurized whole milk 83 mU/mL, at a temperature of 50° C. The protein profile regarding proteolytic activity in skimmed milk powder was analyzed on a SDS-PAGE polyacrylamide gel. And according to the result, it was possible to observe a decrease in the protein profile of the milk due to the increase in incubation time. This result was also demonstrated by measuring residual proteins, using the Bradford reaction, where we observed that both experiments corroborate the assumption that the vegetable enzyme provides hydrolysis of milk proteins. The aqueous extract of *L. leucocephala* seeds was subjected to toxicity testing using a bioindicator. It was possible to demonstrate that no toxic environment was generated after 24 hours of exposure of the crustaceans, *Artemia salina*, to different concentrations of the aqueous extract. Through this research, it was possible to describe a new milk coagulant. Furthermore, the enzyme demonstrated stability in the presence of detergents and organic solvents, demonstrating the potential use of this enzyme in the industrial production of detergents and bioactive peptides, respectively.

Keywords: *L. leucocephala*, coagulant, characterization, proteolytic activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de hidrólise das proteases.....	31
Figura 2: Mecanismo de quebra enzimática.....	37
Figura 3: Subdivisão das serino proteases	41
Figura 4: Mecanismo de hidrólise de serino proteases	42
Figura 5: Estrutura geral da tripsina.....	43
Figura 6: Reação de hidrólise do BApNA catalisada pela tripsina.....	44
Figura 7: Descrição de diferentes partes da planta <i>Leucaena leucocephala</i>	47
Figura 8: Especificidade da protease do extrato <i>L. leucocephala</i>	63
Figura 9: Avaliação da atividade proteolítica do extrato das sementes <i>L. leucocephala</i> em função da concentração de proteínas diante da hidrólise do BApNA.....	65
Figura 10: Avaliação da atividade em proteolítica do extrato das sementes <i>L. leucocephala</i> em função da tempo diante da hidrólise do BApNA.....	66
Figura 11: Atividade do extrato da <i>L. leucocephala</i> e efeito da sazonalidade na hidrólise do substrato BApNA.....	70
Figura 12: Avaliação do pH ótimo na atividade em proteolítica do extrato das sementes <i>L. leucocephala</i>	72
Figura 13: Avaliação da estabilidade na atividade em proteolítica da serino protease do extrato das sementes <i>L. leucocephala</i> em diferentes pH.....	73
Figura 14: Avaliação da temperatura ótima na atividade em proteolítica do extrato das sementes <i>L. leucocephala</i> diante da hidrólise do BApNA.....	75
Figura 15: avaliação da estabilidade térmica na atividade proteolítica no extrato das sementes <i>L. leucocephala</i> diante na hidrólise do BApNA.....	76

Figura 16: Análise dos efeitos dos íons metálicos na atividade proteolítica da serino protease presente no extrato das sementes da <i>L. leucocephala</i>	77
Figura 17: Efeito dos solventes orgânicos na atividade proteolítica da serino protease presente nas sementes da <i>L. leucocephala</i>	79
Figura 18: Efeito dos agentes surfactantes na atividade proteolítica da serino protease presente nas sementes da <i>L. leucocephala</i>	81
Figura 19: Efeito da toxicidade do extrato <i>L. leucocephala</i> frente ao microcrustáceo <i>A. salina</i>	82
Figura 20: Ação coagulante do Extrato das sementes <i>L. leucocephala</i> :...	84
Figura 21: Curva de tempo da ação coagulante do extrato das sementes de <i>L. leucocephala</i>	85
Figura 22: Teste de estabilidade térmica na ação coagulante do Extrato das sementes <i>L. leucocephala</i>	86
Figura 23: Ação coagulante do extrato das sementes de <i>L. leucocephala</i> frente ao leite integral pasteurizado.....	87
Figura 24: Efeito da temperatura ótima da ação coagulante do extrato enzimático das sementes da <i>L. leucocephala</i>	88
Figura 25: Verificação da atividade coagulante por meio de eletroforese em SDS-PAGE:.....	90
Figura 26: Dosagem de proteínas residuais no soro do leite.....	91
Figura 27: Curva de proteína na ação coagulante do extrato das sementes de <i>L. leucocephala</i>	92
Figura 28: Curva de concentração de CaCl_2 na ação coagulante do extrato das sementes de <i>L. leucocephala</i> a reação ocorreu a 37°C.....	94
Figura 29: Curva de concentração de CaCl_2 na ação coagulante do extrato das sementes de <i>L. leucocephala</i> a reação ocorreu a 50°C.....	95

LISTA DE TABELAS

Quadro 1: Aplicação biotecnológica de catalise enzimática.....	26
Quadro 2: Classificação internacional de enzimas: Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular-----	29
Tabela 1: Inibidores utilizados frente a serino proteases da <i>L. leucocephala</i>	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

EDTA: Ácido Etilenodiamino tetracético

PMSF: Fluoreto de Fenilmetil Sulfonil

DTT: Ditionitrosol

BAPNA: N α -benzoíla-L-Arginina-*p*-nitroanilida

DMSO: Dimetilsulfóxido

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

mg/mL: Miligrama/mililitro

mL: Mililitros

min: Minutos

m/m: Razão massa/massa

pH: Logaritmo da atividade de íons hidrônio

PIB: Produto Interno Bruto

SDS – PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Indústria de alimentos e bebidas.....	16
2.2	Cadeia produtiva do leite.....	17
2.3	Micela de caseína	20
2.4	Tecnologia na produção de queijo	21
2.5	Enzimas biotecnológicas.....	25
2.6	Proteases.....	30
2.7	Proteases na indústria de detergentes.....	32
2.8	Proteases na indústria de alimentos e bebidas	34
2.9	Proteases de plantas	35
2.10	Tripsina.....	40
3.	OBJETIVOS	50
3.1	Objetivo geral.....	50
3.2	Objetivos específicos	50
4.	METODOLOGIA.....	51
4.1	Obtenção das sementes e Identificação da espécie <i>L. leucocephala</i>	51
4.2	Preparo do extrato bruto das sementes <i>L. leucocephala</i>	51
4.3	Ensaio enzimático	52
4.3.1	Efeito de diferentes substratos na atividade proteolítica do extrato bruto da espécie <i>L. leucocephala</i>	52
4.3.2	Efeito da concentração do extrato bruto da espécie <i>L. leucocephala</i> na hidrólise do substrato BApNA (N- α -benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide)..	52
4.3.3	Efeito da maturação das sementes da espécie <i>L. leucocephala</i> na atividade proteolítica.....	53
4.3.4	Efeito do tempo de incubação na atividade proteolítica do extrato bruto da espécie <i>L. leucocephala</i>	54
4.3.7	Efeito de diferentes inibidores na atividade proteolítica do extrato bruto da espécie <i>L. leucocephala</i>	55
4.3.8	Efeito dos íons metálicos na atividade proteolítica do extrato bruto da espécie <i>L. leucocephala</i>	55

4.3.9	Efeito dos solventes orgânicos na atividade proteolítica do extrato bruto da espécie <i>L. leucocephala</i>	56
4.3.10	Efeito dos detergentes na atividade proteolítica do extrato bruto da espécie <i>L. leucocephala</i>	56
4.4	Teste de coagulação de leite desnatado	57
4.4.1	Efeito do período de encubação na atividade coagulante do leite em pó reconstituído pelo extrato bruto das sementes da espécie <i>L. leucocephala</i>	57
4.4.2	Efeito da concentração proteica na atividade coagulante do leite em pó reconstituído pelo extrato bruto das sementes da espécie <i>L. leucocephala</i>	58
4.4.3	Efeito da concentração do cálcio na atividade coagulante do leite em pó reconstituído pelo extrato bruto das sementes da espécie <i>L. leucocephala</i>	58
4.4.4	Teste de coagulação de leite integral pasteurizado pelo extrato bruto das sementes da espécie <i>L. leucocephala</i>	59
4.4.5	Efeito da estabilidade térmica	59
4.5	Eletroforese SDS-PAGE	59
4.6	Cálculo da atividade coagulante.....	60
4.7	Determinação da concentração da proteína <i>L. leucocephala</i>	60
4.8	Cálculos de unidades enzimáticas	60
4.9	Análise estatística	60
5.	Ensaio de toxicidade com bioindicador	61
5.1.1	<i>Artemia salina</i>	61
6.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	62
6.1	Caracterização da atividade proteolítica do extrato bruto da <i>L. leucocephala</i>	62
6.1.1	Obtenção das sementes de <i>L. leucocephala</i> , preparo do extrato bruto e verificação da atividade enzimática.	62
6.1.2	Caracterização da atividade enzimática no extrato bruto das sementes <i>L. leucocephala</i>	63
6.1.3	Ensaio de Inibição enzimática	66
6.1.4	Efeito da Maturação das Sementes Sobre a Atividade Proteolítica do Extrato de <i>L. leucocephala</i>	68

6.1.5	Ensaio de pH ótimo e estabilidade pH.....	70
6.1.6	Ensaio de temperatura ótima e estabilidade térmica	72
6.1.7	Efeito dos íons metálicos	75
6.1.8	Efeito dos solventes orgânicos na atividade proteolítica da serino- protease presente no extrato das sementes da <i>L. leucocephala</i>	77
6.1.9	Efeito de agentes surfactantes na atividade proteolítica da serino- protease presente no extrato das sementes da <i>L. leucocephala</i>	78
6.1.10	Avaliação de toxidade através de bioindicador	81
6.2	Aplicação Biotecnológica para o extrato bruto da espécie <i>L.</i> <i>leucocephala</i>	82
6.2.1	Teste de coagulação do leite desnatado	82
6.2.2	Estabilidade térmica.....	84
6.2.3	Teste de coagulação de leite integral pasteurizado na ação coagulante 85	
6.2.4	Efeito da temperatura no processo de coagulação do leite	86
6.2.5	Verificação da hidrólise da caseína por eletroforese e dosagem de proteínas solúveis residuais.	88
6.2.6	Efeito da concentração de extrato proteico da <i>L. leucocephala</i> no processo de coagulação do leite.....	90
6.2.7	Efeito da concentração de Ca^{2+} no processo de coagulação do leite.	91
7.	CONCLUSÃO	95
8.	REFERÊNCIAS	96

1. INTRODUÇÃO

A importância da atividade industrial, assim como os impactos na economia moderna estiveram sempre atrelados a produção de bens de consumo. E dentro deste contexto, a indústria de alimentos e bebidas é vista como importantes segmentos no desenvolvimento da economia de diferentes nações pelo mundo. No entanto, durante vários anos esses avanços estiveram vinculados a produção extrativista dos recursos naturais, onde o uso desordenado agravou diversos problemas ambientais (SANTOS, 2020).

Uma visão alternativa que vem ganhando notoriedade é o uso da biotecnologia que é descrita como um seguimento importante no aperfeiçoamento e desenvolvimento científico, pois consegue elaborar mecanismos tecnológicos alternativos, com baixa agressividade ao meio ambiente e, conseqüentemente, maior sustentabilidade. Como ponto importante desta inclinação, temos o uso de enzimas em métodos industriais, pelo quais reagem em condições mais moderadas de temperatura e pH, com baixas concentrações e são mais específicas, do que os processos químicos tradicionais. Além disso, são biodegradáveis e, normalmente, possuem toxicidade baixa ou são atóxicas quando são descartadas no meio ambiente (BILAL et al, 2019). Devido a isso é possível observar a biotecnologia distribuída em diversos setores industriais ligados à alimentação, agroindústria, biodiesel, farmacêuticas, têxtil, couro, látex, gestão de resíduos entre outros (MADHAVAN et al, 2017).

É conhecido que a maioria das enzimas produzidas e comercializadas no mundo pertence à classe das proteases. E essas biomoléculas são utilizadas pela indústria em diversos processos biotecnológicos. A coagulação do leite é um dos passos relevantes na produção de queijo usadas pela indústria de laticínios, esse processo coagulante ocorre por dois métodos conhecidos: por coagulação ácida ou na maioria das vezes, pelo uso de proteases com atividade coagulante de leite (SILVA e CORTEZ, 2022).

A coagulação ácida pode ocorrer por via biológica através da atividade metabólica de bactérias do fermento com a produção de ácido láctico ou pela adição direta de ácidos orgânicos ao leite. As proteases coagulantes de leite são originárias de diferentes fontes como: animal, microbiana e vegetal (SILVA e CORTEZ, 2022).

Nos últimos anos, os coagulantes de leite derivados de plantas tem se tornado uma importante fonte de enzimas em processos biotecnológicos utilizados pela indústria de laticínios. O uso de um coagulante adequado é notável devido ao um crescente consumo de queijo no mundo, associado a uma diminuição na demanda de coalho de origem animal, principalmente, os que são produzidos a partir do bezerro (MOHSIN et al, 2024).

As serino proteases, incluindo as serino proteases de plantas possuem um resíduo de serina ativado, particularmente reativo em seu sítio catalítico e, está envolvida em diversos mecanismos metabólicos nos seres vivos (MANZANO et al, 2017; MINAYA, 2012). As propriedades específicas desse grupo de enzimas a possibilitam como escolhas economicamente viáveis em vários processos industriais, inclusive como coagulantes de leite, diversas proteases de plantas foram descritas como agentes coagulantes principalmente por não necessitarem de íons metálicos, agentes redutores e quelantes como aditivos e, por se mostrarem estáveis em ampla faixa de pH e temperatura (LI et al, 2018).

Assim diante da necessidade difundir estudos direcionados a obtenção de proteínas com viés comercial, objetivamos com este trabalho a verificação de serino proteases de interesse biotecnológico, seguindo de sua caracterização e aplicação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Indústria de alimentos e bebidas

A produção de alimentos é um dos pontos principais de qualquer economia moderna, seja por sua dimensão e necessidade, seja pela rede de setores diretamente e indiretamente relacionados, possuindo uma forte ligação com o setor agrícola e pecuário, tendo em vista que esses domínios são os principais provedores de matéria-prima utilizado nessa indústria. Além da vinculação com setor agropecuário, esse segmento estabelece vínculos com outros setores da indústria de transformação, relações com canais de distribuição, indústria de embalagens, máquinas e equipamentos, entre outras (GOUVEIA, 2006).

A indústria de alimentos e bebidas possui uma extensa relevância na indústria de transformação, na contribuição do produto interno bruto (PIB) e na geração de empregos. De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Alimentação - ABIA (2023), este segmento encerrou 2022 com faturamento R\$ 1,075 trilhão, aumentando em 16,6% o acumulado do ano anterior. No mercado nacional, as vendas chegaram a R\$ 770,9 bilhões, 14,3% a mais que no ano de 2021. Esse faturamento econômico promoveu aumento na produção física e exportação de alimentos no país, o que levou a geração de novos postos de trabalho nesse seguimento.

Em parâmetros globais, a indústria de alimentos e bebidas também possui uma relevância significativa em diversos países e, conseqüentemente, é cada vez maior a presença de empresas especializadas em nichos específicos no setor de alimentos, empresas que têm buscado aumentar sua importância nos principais mercados por meio de fusões, aquisições e desenvolvimento tecnológico (VIANA, 2021).

A indústria, a partir de estudos específicos e da implementação de práticas tecnológicas mais modernas podem desenvolver produtos específicos como alimentos acrescidos de vitaminas e nutrientes, alimentos para dietas especiais – dietéticos, sem glúten e sem lactose, além de formulações direcionadas a centros de saúde e hospitais (ABIA, 2018).

O Brasil também tem buscado protagonismo mundial nesse ramo, no intuito de tornar-se um dos principais centros de produção de alimentos no mundo, mas para isso, é necessário investimento em pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias em todos os elos da cadeia produtiva, além da atualização de leis vigentes em paralelo com as melhores práticas e experiências internacionais (EMBRAPA, 2023).

Dentre os diversos setores da indústria alimentícia, o setor de laticínios possui uma participação bastante significativa na economia brasileira, ocupando o terceiro lugar. A liderança fica com setor de derivados da carne, seguido por cereais e bebidas (chás e cafés) (ABIA, 2023). Portanto, a agroindústria de laticínios exerce um papel estratégico no Brasil, não só pelo aspecto econômico, como também social e nutricional. Além de ser uma das atividades que mais gera empregos no país, ainda contribui para atender a demanda por produção de alimentos (ASSIS et al, 2016).

2.2 Cadeia produtiva do leite

O leite é uma das commodities agropecuárias mais relevantes do globo, ficando entre os 5 produtos mais comercializados, tanto em quantidade como em valor. Cerca de 1 bilhão de pessoas no mundo necessita do leite para a subsistência de 600 milhões de pessoas moram em 133 milhões de fazendas leiteiras espalhadas pelo mundo. Portanto, aproximadamente 10% da população mundial depende diretamente da produção leiteira (GDP, 2017).

A produção mundial de leite em 2023 alcançou aproximadamente 950 milhões de toneladas, um acréscimo de 1,3% em relação a 2022. E esse aumento expressivo na produção de leite tem ocorrido graças a adoção de novas tecnologias empregadas no manejo dos animais leiteiros, nesses últimos anos. Neste panorama, atualmente o Brasil ocupa o quinto lugar como maior produtor de leite no mundo, atrás de Índia, Estados Unidos, Paquistão e China de acordo com dados fornecidos pela Organização para Alimentação e a Agricultura (FAO, 2022; FAO, 2023).

Em relação principais estados produtores de leite no país, Minas Geras lidera como maior produtor nacional, com 1,31 bilhão de litros coletados no

segundo trimestre 2023. Entretanto, apesar do volume bastante expressivo, representa uma queda, ficando 3,1% a baixo do volume coletado no segundo trimestre do ano passado, segundo dados do MILKPOINT (2023).

No mesmo período, os estados da região Sul continuaram a passar por aumentos em seus volumes de captação, com destaque para Santa Catarina, Rio Grande Sul e Paraná. Dessa forma, a região Sul continuou apresentando valores positivos na captação do segundo trimestre (+ 6,3%). No entanto a região Sudeste demonstrou recuo no volume de leite captado quando comparado a dados demonstrado em 2022. Mantendo a região Sul como a principal produtora do Brasil (MILKPOINT, 2023).

Porém, o maior destaque de crescimento percentual de volume de leite captado foi alcançado pela região Nordeste, no período 2023, ficando em 16, 2% superior ao captado em 2022, o maior entre todas as regiões do país. Demonstrando o dinamismo da região na inovação e produção. Os estados que melhor contribuíram para esse aumento foram Alagoas, Sergipe e Ceará, respectivamente (MILKPOINT, 2023). Portanto, o Nordeste aparece como a região mais promissora para o crescimento do agronegócio do país.

Alagoas é o estado Nordestino que melhor apresentou aumento percentual na produção leiteira, com evolução de 0,7 milhão para 1,8 milhão de litros/dia, um crescimento de 159% no período de nove anos, com produtividade média acima da nacional e, isso se deve a emprementação de novas tecnologias empregadas no processo de beneficiamento do leite (EMBRAPA, 2023). O que leva o estado a ocupa quinto lugar como maior produtor de leite no Brasil. Tendo um papel fundamental para o desenvolvimento econômico e social do estado. Em alagoas esse seguimento ocupa o segundo lugar no total de atividades geradora de emprego e renda (SEBRAE, 2023).

Em meados da década de oitenta, o Brasil possuía um sistema de produção leiteira rudimentar com baixa produtividade, orientação técnica escassa, com baixo controle zootécnico de criação, higiene deficitária e, principalmente, ineficácia na fiscalização pelos órgãos governamentais, o que diminuía a qualidade do leite e possibilitava diversas fraudes (SILVA et al, 2012). Posteriormente, a partir da década de 90, iniciou – se o desenvolvimento em nosso país no processo de produção leiteira, proporcionada pela expansão

econômica do Brasil, através da sua entrada no MERCOSUL, o que permitiu fatia no comércio exterior e, principalmente, recuperação do poder de compra da população brasileira (JANK et al, 1990).

Devido a isso, ocorreu um aumento significativo na demanda por novos produtos ligados à indústria de laticínios, exigindo consequentemente rápidas mudanças na gestão desse seguimento alimentício no intuito de oferecer produtos com melhor qualidade para um mercado consumidor mais exigente. Evidentemente que esse desenvolvimento na cadeia produtiva do leite só foi possibilitada com o advento de investimento governamental através dos Ministério da Agricultura juntamente com as Universidades que possibilitou apoio técnico e científico a todos os profissionais envolvidos no ramo dos laticínios, criando naquele momento o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade Leite (PNQL), que teve como objetivo principal “Promover a melhoria da qualidade do leite e derivados, garantir a saúde da população e aumentar a competitividade dos produtos lácteos em novos mercados” (SILVA, 2012).

Além de sua relevância econômica como fonte de renda e sobrevivência para população global, o leite também é considerado uma fonte nutricional essencial. Devido a sua heterogeneidade, o leite possui uma grande quantidade de micro e macronutrientes sendo considerado uma importante fonte energética alimentar no mundo, ofertando, em média, com 5% das necessidades diárias de energia per capita, 10% da demanda de proteína per capita por dia e 9% da necessidades diárias de gordura per capita. Além disso, experimentos demonstraram que muitos constituintes do leite interagem entre si em diversos processos biológicos benéficos (GDP, 2017).

Portanto, o leite é formado por um arranjo de diferentes constituintes sólidos e água. Os componentes sólidos caracterizam aproximadamente 12% a 13% do leite e a água, por volta de 87%. Possui também carboidratos em sua constituição como lactose, com aproximadamente 5% e baixas quantidades de glicose e galactose. As proteínas representam entre 3% a 4% dos sólidos totais presente no leite, sendo a caseína que apresenta maior importância nutricional e é relevante na produção de queijos. Além disso, fornece contribuição significativa de cálcio, magnésio, selênio, riboflavina, vitamina B12 e ácido pantotênico (vitamina B5) (BRITO et al, 2020; GDP, 2017).

Em relação aos lipídios é formado em sua maioria por triacilgliceróis, que são constituídos por ácidos graxos ligados ao glicerol. A gordura do leite é formada por pequenos glóbulos em suspensão na água. A fração gordurosa no leite serve de veículo de vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K), colesterol e outros componentes solúveis em lipídios, como os carotenoides (provitamina A), que caracteriza a cor amarelo-creme ao leite. A quantidade de gordura no leite varia geralmente entre 3,5% e 5,3% (BRITO et al, 2020). Com todas essas vantagens, o leite é um dos alimentos mais consumidos no mundo, nas suas mais diferentes formas. Portanto, o leite é um dos alimentos mais versáteis da indústria de alimentos. Além de ser consumido em sua forma *in natura*, ele também pode ser transformado em diversos derivados lácteos (SIQUEIRA, 2019).

2.3 Micela de caseína

As caseínas são as principais proteínas presente no leite correspondendo a 80% do conteúdo proteico. Elas se caracterizam como proteínas fosforiladas, de cadeia aberta e flexível, que serve como veículo de transportes de micronutrientes em mamíferos (HOLT, 2016; HOLT et al., 2013). No leite, as caseínas estão presentes no formato de estruturas coloidais, chamadas de micelas. Elas são aglomerados porosos, altamente hidratados, formada pelas quatro parcelas de proteínas anfifílicas, α s1-, α s2-, β - e κ -caseína, com tamanho médio de 200 nm (DALGLEISH, 2011; BRASIL et al, 2015).

A estrutura coloidal é basicamente formada por caseína, água e minerais, principalmente sais de fosfato de cálcio, os quais estabilizam a estrutura micelar. As micelas de caseínas constituem estruturas supramoleculares dinâmicas, que se modifica em resposta às alterações nas condições físico-químicas do meio, como pH, temperatura, força-iônica e ação enzimática (DALGLEISH e CORREDIG, 2012; KRUIF e HOLT, 2003). A estabilização da estrutura micelar é alvo de muitos debates e, o que é aceito pela comunidade científica é que a estrutura micelar é essencialmente estabilizada por interações iônicas e hidrofóbicas (BRASIL et al, 2015). A estabilidade das micelas de caseína está diretamente ligada à aplicação do leite na indústria de laticínios (KRUIF e HOLT, 2003).

Em produtos, como leite fluido (pasteurizado ou esterilizado), creme de leite, leite condensado e doce de leite, busca-se a organização das micelas de caseína. No entanto, em produtos como leite fermentado e queijos, procura-se a desestabilização controlada das micelas de caseína na produção desses derivados lácteos. Portanto, a indústria de laticínios em paralelo com os centros tecnológicos buscam otimização das propriedades funcionais das micelas de caseína no intuito de produzir derivados lácteos com melhores texturas, características sensoriais e produção de moléculas bioativas (BROYARD e GAUCHERON, 2015; RANADHEERA et al., 2016).

2.4 Tecnologia na produção de queijo

O queijo é o principal produto alimentício produzido e comercializado no mundo. Além disso, esse segmento da indústria de laticínios absorve aproximadamente 40% da produção total de leite, sendo o principal derivado lácteo em relação à absorção de leite matéria-prima (MILKPOINT, 2022). Entende-se que existem mais de 2000 tipos diferentes de queijos, com diferenciação no tipo de leite utilizado, insumos e métodos de produção (SILVA e CORTEZ, 2022).

A demanda mundial de produção de queijo, atualmente, é cerca de 2×10^7 toneladas, sendo os países da União Europeia (Alemanha e Holanda), os maiores exportadores de queijo em todo o globo e, a maior parte dessa produção, é fabricado através de ação enzimática (ZHENG et al., 2021). No Brasil, com um rendimento de 70,9 bilhões de reais em 2019, a indústria de produtos lácteos é o segundo setor mais importante da economia na área de produtos alimentícios, ficando atrás apenas dos seguimentos de derivados da carne e beneficiados de café, chá e cereais (EMBRAPA, 2020) e, dentre os derivados lácteos, o queijo é o principal produto produzido pela indústria de laticínios. No país, o consumo representa a 5.9 kg / hab /ano, com acréscimo de 68% nos últimos 6 anos, devido principalmente a mudança no perfil dos consumidores no país, que apresenta população na maioria jovem e que busca alimentos mais nutritivos, com maior praticidade, conveniência e personalização (GOMES et al, 2017).

O processo de produção de queijos pode ser considerados uma forma de concentração de sólidos totais do leite, já que mediante a esse procedimento, os principais componentes do leite (caseína, gordura e alguns sais minerais) encontra-se aglomerados numa matriz gelatinosa. Em contrapartida, os componentes solúveis (carboidratos, minerais e proteínas do soro etc.), são enviadas para fase aquosa, o soro do leite (SILVA e CORTEZ, 2022).

Na fabricação do queijo, o leite passar por um processo conhecido como coagulação do leite. Esse fenômeno consiste na mudança do leite da fase líquida para gel, também conhecida como coalhada. Este processo é devido uma mudança físico-química nas micelas de caseínas, que podem ocorrer por meio de acidificação ou ação enzimática (SILVA e CORTEZ, 2022).

Os coagulantes ácidos mais empregados são os ácidos láctico, cítrico e acético, na coagulação direta. Neste caso, o pH diminui de imediato e rapidamente ocorre o coagulação. Além disso, a coagulação ácida pode ocorrer também por vias biológicas através da adição de bactérias produtoras de ácido, esse processo ocorre pelo metabolismo bacteriano utilizando lactose que leva a produção de ácido orgânico e, conseqüentemente, abaixamento do pH. Em ambos os casos, o pH deve ficar em torno de 4,6 para que aconteça a coagulação (SILVA e CORTEZ, 2022).

Já os agentes coagulantes enzimáticos podem ser de origem animal, microbiana ou vegetal. As enzimas proveniente de mamíferos são extraídas a partir do estômago enzimático de ruminante (abomaso), composto principalmente por proteases ácidas, com atividade sobre o leite. A maioria dos queijos produzidos pela indústria de laticínios no mundo são preparados com o abomaso proveniente de bovinos lactentes ou adultos. Esse coalho é composto basicamente por duas enzimas proteolíticas, a quimosina e a pepsina. A concentração das duas enzimas varia de acordo com a idade do animal. Portanto, o principal elemento do coalho do bezerro é a quimosina, já em animais adultos o coalho pode ser constituído principalmente por pepsina (SILVA e CORTEZ, 2022; ROGELJ et al, 2001).

A pepsina bovina é bastante proteolítica, e com baixa especificidade em comparação com a quimosina, sendo capaz de causar hidrólise excessiva na caseína e, conseqüentemente, contribuindo com o baixo rendimento e,

aparecimento de sabor amargo ao produto, além de contribuir com a diminuição da validade do queijo (FOX e LAW, 1991). As enzimas microbianas mais utilizadas são extraídas dos fungos *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusilus*, *Endothia parasítica* e *Aspergillus niger*. Já os coagulantes enzimáticos de origem vegetal, ainda são pouco utilizados pelo mercado de laticínios. O mais conhecido é extraído da flor de cardo (*Cynara cardunculus*) utilizado na fabricação do queijo da Serra de Estrela de Portugal (SILVA e CORTEZ, 2022).

Na coagulação enzimática do leite, as enzimas adicionadas clivam as ligações peptídicas específicas entre os aminoácidos fenilalanina (105) e metionina (106) presente na K-caseína (KUMAR et al, 2010). A região C-terminal da K-caseína é particularmente hidrofílica e possui uma carga negativa no pH natural do leite (pH 6.7). Ela protege as micelas de caseína produzindo uma camada que permite a estabilidade das micelas por impedimento estérico e repulsão eletrostática. Uma vez hidrolisadas, ocorre uma redução nas forças de repulsão entre as micelas permitindo a sua aproximação devido as interações hidrofóbicas, começando a primeira fase da coalhada (BRITTEN e GIROUX, 2022).

Ao mesmo tempo, sem a presença da parte hidrofílica da K-caseína, as micelas aumentam a sua afinidade ao cálcio, que está correlacionado à exposição do fosfato micelar. Com a diminuição da distância entre as micelas ocorrem ligações dos fosfatos ligados as micelas com o cálcio livre presente no meio. A produção do fosfato de cálcio e a interações hidrofóbicas entre as micelas convergem para agregação das proteínas e formação da massa do queijo (SILVA e CORTEZ, 2022).

Recentemente, ocorreu um aumento na procura por produção e consumo de queijo, por consequência do crescimento populacional (ELSAMANI et al, 2014; TAJALSIR et al, 2014), em associação ao preço elevado e a limitada quantidade de coalho de origem animal (MOHAMED AHMED et al, 2010). De fato, atualmente, o coalho proveniente do bezerro supre apenas de 20% a 30% da demanda mundial por coagulante de queijo (MAHSIN et al, 2024).

Além disso, o mercado consumidor atual está cada vez mais exigente e, as indústrias de queijo necessitam de coagulantes alternativos para satisfazer os consumidores que por razões religiosas (islâmicas ou judaicas), éticas

(vegetarianos) ou ainda contra alimentos geneticamente modificados, preferem não consumir queijo produzido com coagulante animal (BADGUJAR e MAHAJAN 2014; ROSEIRO et al, 2003; AKTAYEVA et al, 2018).

Com todos os motivos acima descritos, justifica-se a reivindicação pela busca de uma nova enzima com elevada atividade coagulante de leite, baixo custo de preparação e que substitua a renina (TAJALSIR et al, 2014). Consequentemente, houve a necessidade de pesquisar enzimas de coagulação de leite originaria de outras fontes e, diversas preparações enzimáticas provenientes de animais, microbianas e vegetais foram descritas (JACOB et al, 2011).

Nos últimos anos, enzimas de coagulação de leite oriundos de plantas têm despertado bastante atenção na comunidade científica, devido a riqueza de recursos vegetais, fácil extração e purificação do coagulante. Essas proteases são enzimas encontradas nos diferentes tecidos vegetais e podem hidrolisar as caseínas do leite em diferentes pHs e temperaturas. As principais enzimas de plantas envolvidas em preparações lácteas são pertencentes ao grupo das serinas, cisteínas e aspárticos proteases (SHAH et al, 2014). Semelhante a quimosina, diversas proteases vegetais hidrolisam especificamente a ligação fenilalanina (105) e metionina (106) pertencente a k-caseína, enquanto outras hidrolisam diferentes sítios da k-caseína (AHMED et al, 2010; PIERO et al, 2011).

Portanto, as proteases vegetais que hidrolisam α -caseína e β -caseína contribui com peptídeos que podem influenciar no sabor e textura do queijo (ZHANG et al, 2019). Esses diferentes centros catalíticos das enzimas proteolíticas levam a formação de peptídeos com atividades biofuncionais, como atividade anti-hipertensiva, imunomoduladora e antitrombótica (ALMEIDA e SIMÕES, 2018). Entretanto, a hidrolise geral das caseínas está ligada a atividade proteolítica (PA) da enzima. Uma PA elevada pode estar relacionada ao desenvolvimento de gosto amargo e defeitos na textura do queijo (HARBOE et al, 2010). Estas propriedades e características são influenciadas essencialmente pela atividade da cultura iniciadora e também o tipo de enzima usada na produção do queijo influencia o processo de maturação do queijo (AMIRA et al, 2017).

2.5 Enzimas biotecnológicas

O processo de industrialização associado com a alavancagem da economia mundial, teve participação bastante relevante da indústria alimentícia. No entanto, o aumento desta atividade também acarretou uma elevação pela demanda por matérias-primas e recursos naturais e, conseqüentemente uma maior exploração e degradação do meio ambiente. Com a necessidade e crescimento de novas soluções tecnológicas, atreladas a práticas que protejam a biodiversidade e produção de energia limpa, temos a biotecnologia, que é vista como uma área essencial de aperfeiçoamento e desenvolvimento, pois possibilita demonstrar diversas alternativas para resolver problemas, melhorando produtos e métodos, com impactos positivos nos custos e qualidade de vida. Seus resultados podem ser observados em diferentes setores. Apresentada como um campo em que se analisa a relevância crescente da união entre o espaço da ciência, estudos tecnológicos e produção industrial, a biotecnologia vem sendo usada em um conjunto de indicadores que avalia o nível de desenvolvimento de um país (BANERJEE et al 2000; VAN BEUZEKOM e ARUNDEL, 2009; MENDES et al, 2013).

A biocatálise está progredindo como uma área de tecnologia inovadora no desenvolvimento de catálise química de substituição acelerada, em razão de cinética eficaz e o uso de recursos de modo sustentável. Atualmente, tem ocorrido um aumento vertiginoso no comércio de enzimas em diversos setores ligados a alimentação, agroindústria, biodiesel, farmacêuticas, têxtil, couro, látex, gestão de resíduos entre outros (MADHAVAN et al, 2017). O quadro 1 ilustra as diversas aplicações de catálises enzimáticas na produção biotecnológica.

Quadro 1: aplicação biotecnológica de catálise enzimática

Setor	Enzimas	Aplicação	Referências
Farmacêutica	Nitrila hidrolases, transaminases, monoaminase oxidase, lipase penicilina acilase.	Síntese de intermediários para manufatura de derivados farmacêuticos ativos.	(CHOI et al, 2015); (LI et al, 2012); (MAROUF et al, 2018)
Processamento de alimentos	Tripsina, amilase, glicose, somerase, papaína, pectinase.	Convenção de amido em glicose, produção de xarope de milho rico em frutose, produção de prebióticos, esclarecer desgaste de suco de frutas.	(CHOI et al, 2015); (PANESAR et al, 2013); (KAPPOR et al, 2017); (ELAVARASAN e SHAMASUNDAR, 2016); (BADGUJAR et al, 2016).
Detergente	Proteases, lipases amilase, celulase.	Remoção de manchas, remoção de gordura e óleos, retenção de cor	(DEWAN, 2017) (LI et al, 2012).

Biodiesel	Lipase, celulase, xilanase.	Produção de ácidos graxos metil éster, decomposição de material lignocelulósico para a produção de bioetanol.	(LIEW et al, 2014) (CARDONA et al, 2010) (DEWAN et al, 201) (ZANG et al 201), (TAN et al, 2010)
Papel e celulose	Lipase, celulase, xilanase	Remoção de lignina para melhor branqueamento, melhora na qualidade das fibras	(CHOI et al, 2015); (ROY e PRASAD, 2017); (BHAT, 2000); (BAJPAI, 1999);

Fonte: elaborada pelo autor, 2023

A evolução da biotecnologia ocorreu pela contribuição mútua de diferentes segmentos de pesquisa. A exemplo, temos o desenvolvimento da biologia molecular, associadas com mecanismo de recombinação gênica, assim como evolução na área de proteômica, onde foi possível obter novas descobertas sobre as funções biológicas de cada macromolécula, e também ênfase em estratégias de purificação (ZHANG et al, 2018).

A aplicação de enzimas nos processos biotecnológicos, possibilita uma significativa redução de custos com consequente diminuição do consumo energético. E junto com a melhor atividade do substrato tem contribuído para o crescimento da indústria de enzimas. O mercado mundial de enzimas foi

estimado em 12,1 bilhões de dólares em 2022 e é previsto alcançar 16,9 bilhões de dólares em 2027 (ALLIED MARKET, 2022).

Neste contexto, as proteases são as biomoléculas mais produzidas e, representa 60% de todas as enzimas comercializadas no mundo. O mercado global de proteases foi estimado acima de 3 bilhões de dólares, demonstrando uma taxa composta de crescimento de 6,1% até 2024 (TRONCOSO et al, 2022). E os motivos para o sucesso dessas moléculas se deve a fatores como maior biodegradação, quando comparados a catalisadores não-biológicos, elevada atividade catalítica, seletividade aos substratos específicos, assim como diferenciação no processo de produção (GURUMALLESH et al, 2019).

Em relação a produção enzimática nacional, no ano de 2019, segundo a EMBRAPA (2020), cerca de 30 mil toneladas de enzimas ou preparação enzimáticas foram importadas para o Brasil. Tal valor é bastante expressivo quando comparado ao número de enzimas exportada pelo país, que representa o valor de 9,3 toneladas. Isso ocorre devido a um atraso tecnológico na cadeia brasileira de produção enzimas em relação aos países desenvolvidos, mas ao mesmo tempo demonstra que o crescimento da biocatálise é especificamente importante para o Brasil, não somente pelo tamanho do mercado interno pertinente para esse setor, como também porque o país possui conhecimentos básicos necessários das tecnologias para a produção de biocatalizadores em escala industrial, por processos fermentativos e extrativos, assim como uma grande biodiversidade que pode ser utilizada como fonte de enzimas (ATUNES et al 2010).

A despeito do enorme potencial das enzimas, diversos grupos de pesquisa tem trabalhado no desenvolvimento de processos de purificação de novas enzimas ou evoluindo técnicas que melhoram a catálise de enzimas já conhecidas. A busca por fontes que possam produzir essas biomoléculas é continuo e as estratégias para triagem dessas enzimas oriundas de fontes naturais, como a biologia molecular e imobilização, tem possibilitado esse processo. No entanto, o maior entrave na indústria é encontrar enzimas que resistam as condições impostas pelo processo industrial, como variação na temperatura e pH. Outra dificuldade é o desenvolvimento de estudo científico pela própria indústria. A grande diferença entre as empresas e os centros

universitários prejudica ainda mais a produção de enzimas industriais (DINCER e TELEFONCU, 2007; ELLEUCHE et al, 2014).

Com o aumento no número de novas moléculas enzimáticas isoladas e a complexidade e inconsistência na nomenclatura de enzimas, a União Internacional de Bioquímica criou a comissão de enzimas para sanar esse problema. O relatório inicial produzido pela comissão de enzimas foi publicado em 1961 e promoveu metodologia sistemática para a nomenclatura de enzimas, afim de evitar nomenclatura aleatória de uma mesma enzima estudada por diferentes pesquisadores. Posteriormente, em 1992, foi publicada a sexta edição e nela era possível encontrar detalhadamente cerca de 3200 enzimas diferentes, e anualmente novos dados sobre enzimas são publicados e, consequentemente esse número tem se estendido para mais de 5000 biomoléculas descobertas (ROBINSON, 2015). As enzimas foram agrupadas em seis classes referentes com o tipo de reação que catalisam como: Oxidorredutases, transferases, hidrolases, liases, Isomerases, ligases e translocase (VANDENBERGHE et al, 2020), como pode ser observado no quadro 2.

Quadro 2: Classificação internacional de enzimas: Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.

Classe nº	Nome da classe	Tipo de reação que catalisada
1	Oxidorredutases	Transferência de elétrons.
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise
4	Liasas	Adição de grupos ou ligações duplas
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula
6	Ligases	Formação de ligações
7	Translocase	Catalisa translocação de íons ou moléculas através da membrana

Fonte: Adaptado de VANDENBERGHE, 2020.

2.6 Proteases

As proteases EC (3.4), também conhecida como proteinases ou peptidases, são enzimas que catalisam ligações peptídicas em proteínas e peptídeos. Tais biomoléculas são biologicamente essenciais para todos os seres vivos e, está presente em uma ampla variedade de fontes, compreendendo plantas, animais e micro organismos. Essas enzimas no organismo participam de diversos mecanismos como a digestão de alimentos, ativação de enzimas, coagulação sanguínea e também no transporte de proteínas através da membrana. Alguns pontos específicos das proteases podem classificá-las em diferentes grupos, essas características incluem: sob qual pH essas enzimas exercem atividade ótima, os aminoácidos envolvidos no sítio catalítico, em quais tipos de ligações moleculares ou em qual das ligações irão ocorrer as quebras realizadas por cada protease (KERMASHA e ESKIN, 2021).

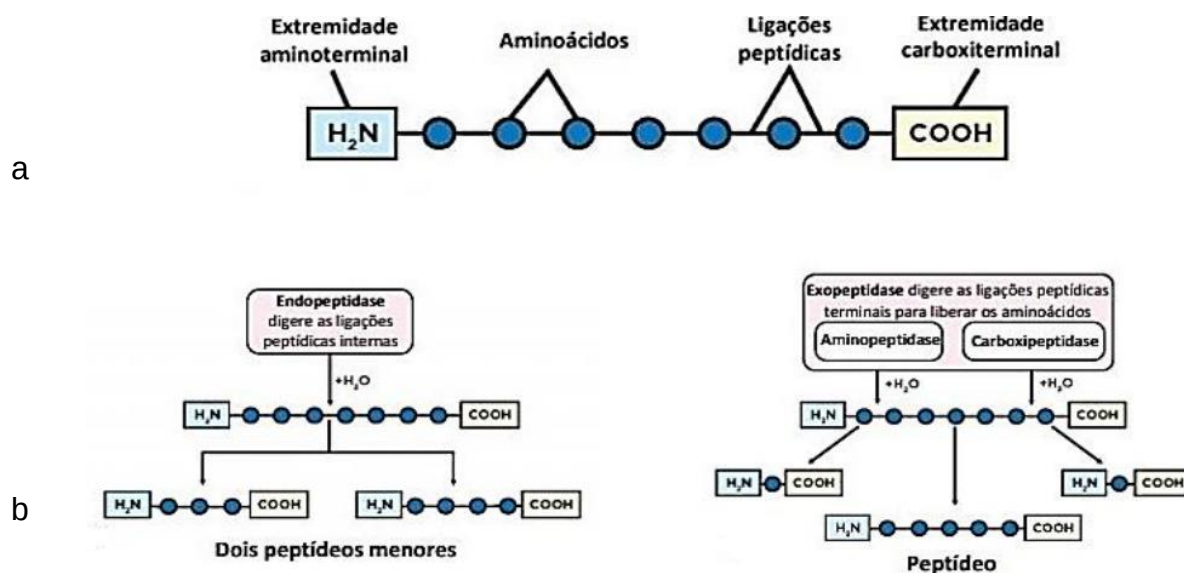
Estas enzimas proteolíticas pertencem às classes das hidrolases (EC 3.b.c.d), seu prefixo “hidro” foi designado a estas biomoléculas por trabalharem através de hidrólise, onde a adição de uma ou mais moléculas de água irão provocar a quebra de outras substâncias. As proteases da subclasse 3.4 são enzimas que fazem parte da família das hidrolases e atuam sobre as ligações peptídicas entre os aminoácidos presentes nas proteínas (figura 1a). Tendo como base o sítio de ação, as proteases podem ser separadas em duas grande classes: as exopeptidases (E. C. 3.4. 11 – 19) e endopeptidases (EC 3.4. 22 – 99) (figura 1b). As exopeptidases atuam nas extremidades da cadeia polipeptídica, que lhe dá a possibilidade de quebrar as ligações peptídicas em aminoácidos e peptídeos livres. As aminopeptidases são enzimas que atuam no lado amino e liberam aminoácidos simples (amino peptidase E. C. 3.4.11), dipeptídio (dipeptidio amino peptidase, E.C. 3.4.14) e tripeptidio (tripeptidio amino peptidase E. C. 3. 4. 14). Esta classe de enzima elimina a metionina N-terminal das proteínas secretadas e daquelas que podem ser expressas de forma heteróloga (RAO et al., 1998; MÓTYÁN et al., 2013; THERON e DIVON, 2014).

As exopeptidases que trabalham na extremidade carboxílica são chamadas de carboxipeptidases e liberam um único aminoácido ou um dipeptidio

(peptídeo dipeptidase E. C. 3.4.13) na região C-terminal da cadeia polipeptídica. Estas enzimas também são classificadas em três diferentes grupos, serino carboxipeptidase, metalo carboxipeptidase e cisteína carboxipeptidase levando-se em conta os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo (RAO et al., 1998; MÓTYÁN et al., 2013; THERON e DIVON, 2014)

. As endopeptidase se qualificam por hidrolisar as ligações peptídicas nas regiões internas das cadeias polipeptídicas. Estas proteases são industrialmente mais importantes que as exopeptidases e se classificam de acordo com a especificidade do substrato, mecanismo catalítico, estrutura tridimensional e resíduos de aminoácidos existente no sítio ativo (SUMANTHA et al, 2006)

Figura 1: mecanismo de hidrólise das proteases



Fonte – NASCIMENTO et al, 2021.

Atualmente o aprofundamento do conhecimento relacionado às proteases permitiu produzir novas descobertas sobre sua estrutura e o mecanismo pelo qual atuam. Assim, as proteases são classificadas levando em consideração as moléculas presentes no sítio catalítico, sendo assim, o banco de dados particular das proteases desenvolvido por MEROPS, classificam essas enzimas como pertencente as famílias: aspártico (A), cisteína (C), glutâmico (G), metalo (M), asparagina (N), misto (P), serina (S), treonina (T) e desconhecido (U) (MEROPS, 2022; MURI, 2014).

2.7 Proteases na indústria de detergentes

Os detergentes são produtos químicos que diminuem a tensão superficial de um líquido, sendo estes compostos, conhecido como tensoativos. Estas substâncias são materiais sintéticos produzidos a partir de derivados do petróleo, foram introduzidos comercialmente com o advento da segunda guerra mundial, devido à escassez de óleos e gorduras necessárias a fabricação de sabões (SILVA et al, 2011). Os detergentes são similares estruturalmente a constituição de um sal orgânico, com uma longa cadeia de carbono e hidrogênio hidrofóbica (apolar) e, uma extremidade hidrofílica (polar). Sendo assim, as moléculas de detergentes são classificadas como anfipáticas. Essa disposição estrutural possibilita que moléculas de gorduras sejam sequestradas pela porção alquílica do detergente e retiradas através do fluxo de água (SANTOS, 2020).

Assim, os detergentes comerciais mais elementares são constituídos por uma mistura composta de diversos ingredientes ativos que diferem na finalidade do detergente. Além dos surfactantes como constituinte principal, os detergentes contém estabilizadores que trabalham sinergicamente de forma eficiente no material sujo (SINGH et al, 2018).

É importante ressaltar que as questões ecológicas tem demonstrado ser cruciais no desenvolvimento do mercado de detergentes. As atuais preocupações com o meio ambiente exigidas pela legislações ambientais, levou à um aumento na produção de produtos de limpeza domésticos baseados em constituintes biodegradáveis e considerados menos nocivos para a natureza. Desta forma, é importante o desenvolvimento de pesquisa objetivando o desenvolvimento de novas formulações de detergentes que incluam componentes eficazes e ambientalmente mais amigáveis (GIRELLI, 2013).

Assim, com o passar dos anos, enzimas foram largamente utilizadas pela indústria na formulação de novos detergentes. As proteases são as enzimas normalmente mais utilizadas, mas lipases, amilases, celulasas, mananases e pectinases também são adicionadas em detergentes. As proteases alcalinas hidrolisam ligações peptídicas em proteínas, peptídios e aminoácidos livres; as amilases limpam clivando ligações α -glicosídicas do amido em açúcares mais simples; As lipases hidrolisam ligações éster e hidrolisam gorduras em ácidos

graxos livres e glicerol; e as celulases clivam ligações β – glicosídicas eliminando sujeiras ligadas a microfibras de algodão, cuidando do tecido e aumentando a durabilidade das roupas por mais tempo (GURKOK, 2019).

Além disso, detergentes a base de enzimas são biodegradáveis e com menor impacto ao meio ambiente, em relação as formulações tradicionais que contém substâncias cáusticas, ácidas e solventes tóxicos que provocam desgaste de tecidos e equipamentos (MITIDIERI, 2003). Os detergentes que recebem enzimas como um dos seus constituintes, são destinadas limpezas de caldeiras de grandes indústrias, hospitais e atividades domésticas (SRILAKSHMI et al., 2015). Estudos indica que cerca de 25% a 30% das enzimas comerciais são empreendidos na produção de detergentes, com maior impacto para enzimas provenientes do grupo das amilases e proteases (GURUMALLESH et al., 2019).

O benefício mais significativo na utilização de detergente biológico é que são eficiente na remoção de sujidades a temperaturas mais baixas e diminuem o consumo de água. Desta maneira, torna-se ecologicamente corretos e financeiramente mais econômicos, reduzindo o consumo de energia sem afetar o desempenho da limpeza (GURKOK, 2019). Estima-se que o uso de detergentes a base de enzimas favorece a lavagem de roupas a 30°C, em vez de lavagens em temperaturas na faixa de 40°C ou 60°C, possibilitando lavagens mais sustentáveis e economicamente viáveis (SANTOS, 2020).

As proteases são as enzimas mas utilizadas como aditivo em detergentes e podem ser obtidas de diversas fontes, no entanto as bacterianas são as mais utilizadas. A utilização de proteases em detergentes iniciou-se em meados da década de 60, por meio do uso de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus licheniformis* (MAURER, 2004). Os microrganismos são as principais fontes de produção de enzima no mundo, mas com todos os requisitos em eficácia catalítica e economia no processo de produção, a pesquisa por fontes alternativas de biocatalizadores se mostra de grande relevância.

Em virtude desta decorrência mercadológica, o Brasil, seguindo os países desenvolvidos, passou a disponibilizar grandes montantes em tecnologia, com o intuito de desenvolver seus produtos e assim aprimorar a eficiência deles. Esses avanços se deram em diversas áreas e seguimentos industriais e, com relação ao enfoque deste tópico, destaca-se que aproximadamente 80% dos

detergentes comercializados contam pelo menos uma enzima proteolítica como componente ativo e, conseqüentemente com efeito mais significativo aos detergentes produzidos de forma tradicional (SANTOS, 2020).

2.8 Proteases na indústria de alimentos e bebidas

O uso de enzimas como agentes modificadores de propriedades estruturais de alimentos e bebidas tem sido amplamente difundida pela indústria. Na verdade, a introdução de enzimas na produção de alimentos é descrito a milhares de anos por culturas tradicionais (COLLADOS et al, 2020).

Sendo que com o surgimento da biotecnologia, os biocatalizadores passaram a ter um papel primordial na produção alimentícia, inclusive com menores custos de produção. E abrangem diversos seguimentos da indústria de alimentos como a fabricação de bebidas (cervejas, vinhos e sucos), processamentos de queijos, amaciantes de carnes, produção de hidrolisados funcionais, panificação, produção de adoçantes artificiais e, na recuperação/aproveitamento de resíduos e subprodutos (SRILAKSHMI et al, 2015).

Além disso, outros efeitos benéficos observados na manipulação de alimentos estão relacionados com valor nutricional e funcional, melhor absorção, alterações na textura e sabor, assim como refinamento na capacidade antioxidante e diminuição de componentes alergênicos (VAN BOEKEL, 2010).

Anteriormente, no início do desenvolvimento da biotecnologia, as metodologias utilizadas nas modificações funcionais das proteínas eram realizadas por meio do uso de ácidos fortes ou álcalis, que conseqüentemente, ocasionava modificações estruturais em regiões específicas da molécula (THYS, 2004). Por outro lado, com o uso de enzimas proteolíticas foi possível obter vários benefícios, quando comparados com os métodos tradicionais, como maior especificidade, inexistência de toxicidade e menor concentração. Na realidade, a hidrólise proteica é um procedimento com o objetivo de agregar valor, funcionalidade e diversificação na aplicação em matérias de pouca utilização convencional, subprodutos e resíduos do processo industrial (ZHANG et al, 2018).

As aplicações de enzimas proteolíticas pela indústria de alimentos inclui a produção de peptídeos bioativos. Estas moléculas orgânicas são de baixo peso molecular formado por 2 a 20 aminoácidos ligados por ligações peptídicas. Os peptídeos bioativos possuem atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensiva e imunomoduladora (ASHAOLU, 2020). He e colaboradores (2015) sugeriram que antioxidantes produzidos a partir de proteínas que foram enzimaticamente hidrolisadas podem reduzir o risco de doenças crônicas, incluindo câncer e doenças cardiovasculares.

Outra aplicação inovadora da utilização de proteases está também relacionada a hidrólise de proteínas da soja. Proteases alcalinas e neutras proveniente de microrganismo são aptas a atuar na manipulação de proteínas da soja, possibilitando mudanças moleculares, que aumentam suas propriedades funcionais. Essas modificações permitem uma maior solubilidade dos peptídeos formados, resultando em um rendimento proteico mais elevado e diminuição do sabor amargo. Os hidrolisados são aplicados em bebidas à base de proteínas e na formulação de alimentos dietéticos (RESENDE et al 2016; COSCUETA et al, 2019). Liang e colaboradores (2020) demonstraram que proteínas da soja tratadas com proteases resultou numa maior formação de espumas e melhoramento nas características interfaciais, o que evidencia a sua utilidade no processamento de alimentos.

No ramo dos laticínios, as proteases exercem um papel relevante na produção de queijos, pois estão envolvidas no processo de coagulação e maturação de queijos (CRABBE, 2004). O coagulante mais utilizado nesse processo é a quimosina (EC 3.4.23.4) proveniente do abomaso de bezerros. No entanto, coalhos provenientes de outras fontes se destacam como alternativas importantes na manufatura de queijos, por apresentarem maior disponibilidade e por, em certo momento, atribuir características diferenciadas (SHAH et al, 2014).

2.9 Proteases de plantas

As proteases de plantas exercem diversas funções biológicas importantes ao longo do ciclo de vida vegetal, como apoptose, senescência, abscisão, amadurecimento dos frutos, crescimento e homeostase de nitrogênio

(GRUDKOWASKA e ZAGDANSKA, 2004; VAN DER HOORN, 2008; LIU et al, 2018; TORNKVIST et al, 2019).

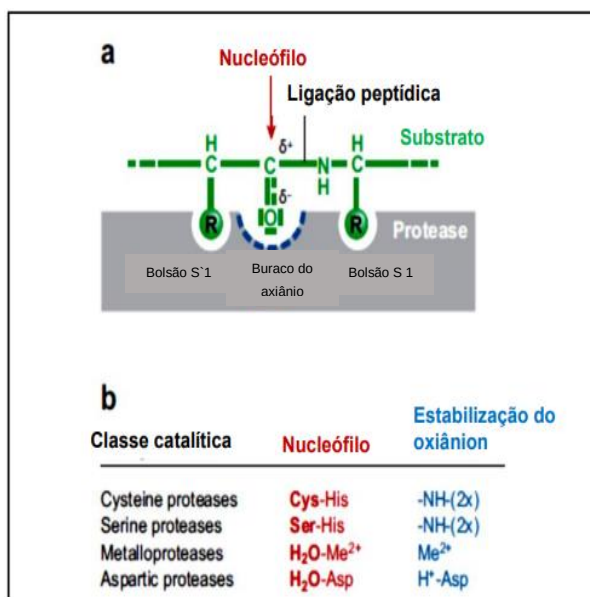
Em resposta a estímulos abióticos e bióticos, as enzimas proteolíticas são responsável pela hidrólise de proteínas foliares e radiculares com a finalidade de remobilização de nutrientes (DIAZ – MENDOZA et al, 2014; VELASCO – ARROYO et al, 2016;2018; GOMES - SANCHEZ et al, 2019; JAMES et al, 2019), além disso, elas também responde a ataque de agentes patogênicos como insetos e ácaros (VAN DER HOORN e JONES, 2004; SHINDO e VAN DER HOORN, 2008; MISAS – VILLAMIT et al, 2016; DIAZ – MENDOZA et al, 2017). As proteases vegetais são responsável pela germinação das sementes, através da ativação de outras proteínas presentes em sementes e grão de cereais (GRUDKOWASKA e ZAGADANSKA, 2004; CAMBRA et al, 2012; DIAZ – MENDOZA et al, 2016; SZEWINSKA et al, 2016; LIU et al, 2018; RADCHUK et al, 2018).

Assim como ocorre com as proteases provenientes de animais, as enzimas produzidas por vegetais são capazes de hidrolisar ligações peptídicas de proteínas, agindo especificamente nas regiões C-terminal e N-terminal, devido a ataques nucleofílicos à carbonila e, posterior estabilização do oxigênio numa fenda axiânion, o que torna o átomo de carbono mais vulnerável a um ataque de um nucléofilo ativado (figura 2a). Dependendo do tipo de ataque e, a ocorrência dos grupos moleculares envolvidos, as proteases podem ser classificadas como: cisteíno, serino, aspártico e metaloproteínase (figura 2b) (VAN DER HOORN, 2008). Os grupos de proteases mais disponíveis nas plantas são as cisteína, seguidas pelas serinas e depois aspártico proteases (TRONCOSO et al, 2022).

As proteases são amplamente distribuídas nos seres vivos e representam aproximadamente 2% do genoma humano e 1-5% dos genomas de espécies infecciosas (PUENTE et al, 2003). Nas plantas, o gênero *Arabidopsis* codifica mais de 800 proteases, que estão difundidas em aproximadamente 60 famílias, que pertencem a 30 clãs diversificados (VAN DER HOORN, 2008). Os genes que representam essas famílias e sua distribuição são bem conservados dentro do reino vegetal (GARCÍA – LORENZO, 2006).

Diversos processos industriais utilizam mecanismos de quebra proteolítica feito por proteases, algumas das quais são extraídas de plantas. As preparações enzimáticas de extratos de plantas vem sendo usados em processos industriais há vários anos, mesmo antes de se ter conhecimento sobre a natureza metabólicas das enzimas. A maioria das proteases comerciais é obtida de fontes microbianas, mas enzimas vegetais tem ganhado cada vez mais notoriedade, com aplicações em processos industriais, biotecnológicos e farmacológicos (TROCOSO et al, 2022).

Figura 2: Mecanismo de quebra enzimática



Fonte: Adaptado de Van Der Hoorn, 2008

As proteases aspárticas exercem suas atividades catalíticas em pH baixo e são menos abundantes em vegetais comparados as proteases de serina e cisteína (GONZÁLES-RÁBADE et al, 2011). As proteases aspárticas de organismos superiores incluem pepsinas, catapsinas e reninas. Diversas proteases aspárticas de plantas pertencem à família A1 com enzimas semelhantes à pepsinas de outras fontes e, contém dois resíduos de ácidos aspárticos e um resíduo de cisteína responsável pela sua atividade catalítica (SIMÕES e FARO, 2004). Nos vegetais as proteases aspárticas são responsáveis pela digestão de plantas carnívoras e degradação de proteínas em

diversas fases de desenvolvimentos, durante as respostas à estresses, defesa contra agentes patogênicos e senescência (GONZÁLEZ-RÁBADE et al, 2011).

Na indústria de laticínios, a produção de queijo depende essencialmente da presença de proteases aspárticas no coalho, que demonstram hidrólise específica de proteínas, especialmente caseína. A principal aplicação das proteases aspárticas vegetais é na indústria de laticínios usadas como agentes coagulantes no processo de fabricação de queijos. Os coagulantes vegetais são utilizados como agentes coagulantes desde os primórdios da civilização. E assim como coagulantes provenientes de outras fontes, as proteases de plantas podem ser usadas no processamento de queijo, pois podem hidrolisar todas as caseínas alfa, beta e gama. E em consequência disso o queijo adquire sabor, textura e composições ideais e com grande demanda no mercado global (COELHO et al, 2017).

Aghamaali e colaboradores (2017) purificaram e caracterizaram uma protease aspártica proveniente do fruto *Withania coagulans* que demonstrou uma atividade coagulante de leite bastante expressiva. As flores de *Cynara cardunculus* são tradicionalmente usadas como coagulante de leite em diversas regiões da Europa e África. Essas flores contêm proteases aspárticas com alta atividade coagulante de leite. Além disso, Emira e colaboradores (2018) liofilizaram flores de *Cynara cardunculus* e os resultados experimentais revelaram que as flores liofilizadas produziram coalho com melhores propriedades de coagulação.

As proteases vegetais pertencentes ao grupo das cisteínas proteases possuem resíduos de cisteína e histidina, importantes no seu sítio ativo, e atuam principalmente no processo de mobilização, maturação, degradação de proteínas de armazenamento durante a germinação, manutenção e senescência celular (MARTINEZ et al, 2019). Papaína (E.C. 3.4.22.2), bromelaína (E. C. 3.4.22.32) e ficina (E.C. 3.4.22.3) extraídas respectivamente do mamão, abacaxi e figo, são as proteases vegetais mais conhecidas usadas pela indústria de alimentos, insumos farmacêuticos, preparação de compostos terapêuticos e produtos nutracêuticos (MAZORRA-MANZONANO et al, 2017). Outras cisteínas proteases vegetais bem descritas na literatura incluem a zingipaína (E.C. 3.4.22.67), do rizoma do gengibre, e a acitinidina (kiwilin) do fruto do kiwi (Choi

et al.,1999, Ha et al., 2012; Teh et al., 2016). No entanto suas aplicações comerciais ainda não foram descritas (DAVID TRONCOSO et al, 2022).

Apesar da cisteínas proteases estarem presentes em maior quantidade na fisiologia das plantas, mais de 200 tipos de serina proteases são expressas pelo genoma vegetal. As serinas proteases possuem um resíduo de serina ativado, particularmente reativo em seu sitio catalítico. Estas enzimas estão envolvidas em diversos mecanismos metabólicos nas plantas como microsporogênese, simbiose, transdução de sinal, resposta hipersensível, diferenciação celular e senescência (MANZANO et al, 2017; MINAYA, 2012).

A diversidade das propriedades distintivas das serinas proteases possibilitam essas enzimas como escolhas baratas para hidrolisar proteínas em vários seguimentos comerciais. Há vários anos são utilizadas na indústria de detergentes, alimentos, couro, têxtil, tratamento de água, recuperação de prata e farmacêutica (MATKAWALA et al, 2021). É sabido que as proteases da classe das cisteínas são amplamente utilizadas na indústria de alimentos e medicamentos. No entanto, suas reações catalíticas são afetadas pela oxidação do ar, íons metálicos, agentes redutores ou quelantes. Contudo, várias serino proteases, incluído proteases de plantas, não necessitam de nenhum cofator. Assim, elas são alternativas economicamente viáveis para aplicação na indústria (FEIJOO-SIOTA e VILLA, 2011).

Uma serino protease alcalina termoestável isolada do sarcocarpo do fruto do melão, chamada cucumisina (EC 3.4.21.25) exibiu ter importante atividade de coagulação de leite em comparação com outras proteases de plantas como papaína e ficina (SILVA-LÓPES e GONÇALVES, 2019). Além disso, uma cucumisina-símile purificada das folhas de *Solanum tuberosum* (StSBTc-23) foi capaz de hidrolisar o fibrinogênio humano e produzir quebra do coágulo de fibrina dependente da dose. Além disso, esta enzima inibiu a agregação plaquetária e não exibiu atividade citotóxica em eritrócitos humanos *in vitro* em todas as concentrações testadas, sugerindo que (StSBTc-23) poderia ser avaliado como um agente no combate de distúrbio tromboembólicos (SILVA – LÓPES e GONÇALVES, 2019).

A utilização de métodos bioquímicos em escalar industrial vem com o passar dos anos demonstrando muita praticidade na obtenção de produtos de uso

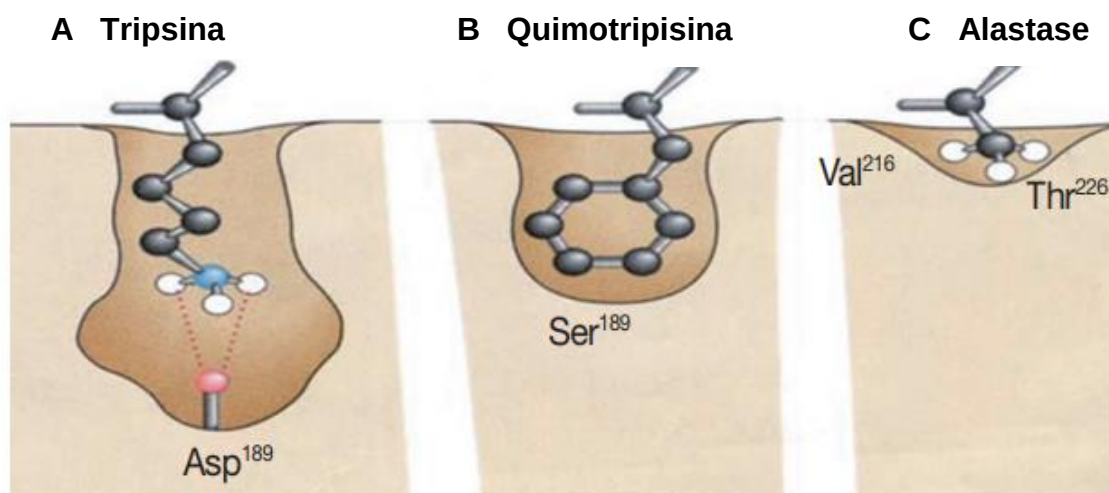
cotidiano, de maneira mais econômica e ecologicamente correta. Apesar das proteases provenientes de microrganismos contribuírem com a maior percentagem do mercado destas enzimas produzida no mundo, as proteases purificadas de tecido vegetal também tem contribuindo expressivamente com o desenvolvimento da biotecnologia (MATKAWALA, et al, 2022).

2.10 Tripsina

De todas as proteases descritas na seção anterior, temos as serino proteases, que possuem diversos trabalhos descritos na literatura, por serem responsáveis por vários processos fisiológicos nos seres vivos (GOHARA e DI CERA, 2011). As serino proteases são assim designadas por possuir um modelo catalítico em que há a participação de um resíduo de serina ativado no sitio catalítico (MINAYA, 2012). Além disso, enzimas agrupadas nessa família possuem em comum a participação dos aminoácidos histidina (His) e aspartato (Asp) no sitio ativo (YANG et al, 2015). A depender da especificidade com os seus substrato, as serino proteases podem ser divididas em três subfamílias: tripsina, quimotripsina e elastase (Figura 4) (YANG et al, 2015).

A tripsina possui um resíduo de aspartato com carga negativa presente no sitio catalítico da enzima, pelo qual favorece a hidrólise de ligações peptídicas na região carboxiterminal de resíduos de lisina (Lys) e arginina (Arg), aminoácidos estes com carga positiva (Figura 3A). A quimotripsina atua particularmente em resíduos hidrofóbicos como o triptofano (Trp), fenilalanina (Phe) e tirosina (Tyr) (Figura 3B). Por fim, o tipo elastase, que por possuir um sitio ativo menor em relação ao sitio catalítico da tripsina e quimotripsina, atua essencialmente em aminoácidos menores como alanina (Ala), glicina (Gly) e valina (Val) (Figura 3C) (YANG, 2015).

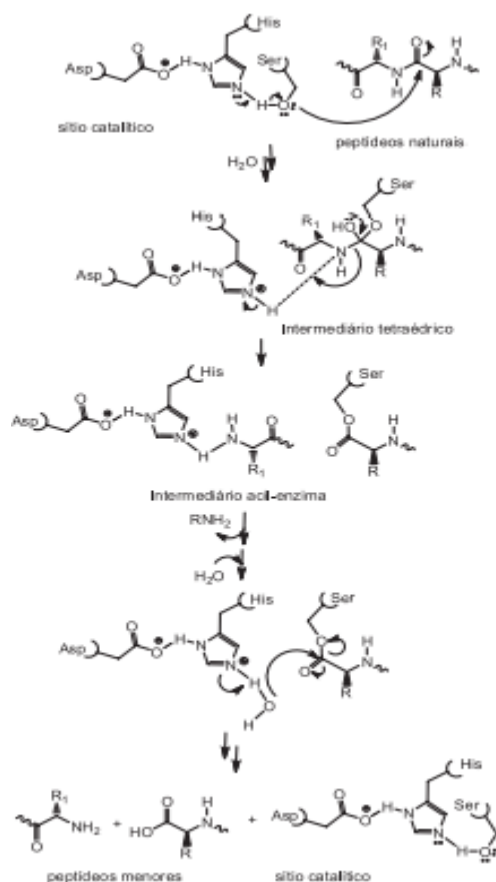
Figura 3: Subdivisão das serino proteases



Fonte: Adaptado de Yang 2015.

O mecanismo catalítico envolvendo serino proteases pode ser visto na Figura 4. O mecanismo ocorre inicialmente com o ataque nucleofílico promovido pelo resíduo de serina 195 ao grupo carbonila da ligação peptídica do substrato. Esse processo é facilitado pela histidina 57, que retira um próton do grupo hidroxila da serina 195 tornando este oxigênio com carga parcialmente negativa. Ao passo que o substrato interage com a tríade catalítica, o oxigênio da hidroxila promove um ataque nucleofílico ao grupo carbonila, formando um intermediário tetraédrico e, o oxigênio da carbonila adquire carga parcial negativa. Esta carga é estabilizada por efeito de ligações de hidrogênio presentes no bolsão da enzima chamado de oxianion. O intermediário produzido possui vida curta e, ao restabelecer a ligação dupla da carbonila, levava ao colapso do intermediário tetraédrico e a formação do complexo acil-enzima. A água presente no sítio ativo é desprotonada, onde a hidroxila efetua um novo ataque nucleofílico ao carbono carbonílico, seguido pela nova protonação da cadeia lateral de histidina, que leva formação mais uma vez do intermediário tetraédrico. Por fim a ligação dupla é reestabelecida, possibilitando que a enzima exerça uma nova reação (STRYER et al, 2006).

Figura 4 – Mecanismo de hidrólise de serino proteases



Fonte: MURE, 2014

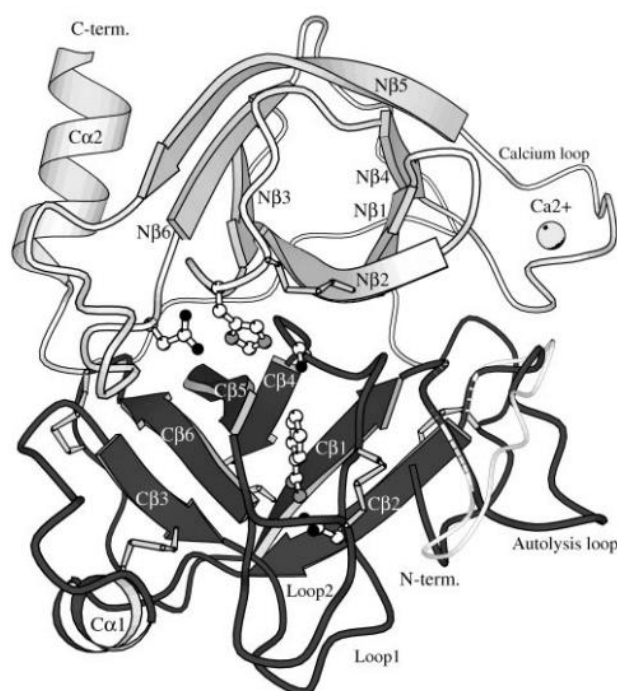
As tripsinas são enzimas digestivas purificadas de diferentes espécies, em animais superiores são excretadas pelo pâncreas, na forma de pró-enzima, denominada tripsinogênio (zimogênio). O tripsinogênio bovino é uma molécula formada por uma única cadeia polipeptídica de 229 aminoácidos estruturada por seis pontes dissulfetos. No processo digestivo de mamíferos, quando os alimentos previamente hidrolisados pela enzima pepsina chegam ao intestino, ocorrem a liberação do tripsinogênio que posteriormente sofre a ação de enteropeptidases que age removendo o hexapeptídeo na extremidade N-terminal H₂N-Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys liberando a forma ativa da molécula, a tripsina, que em sua forma ativa dará continuidade ao processo de degradação das proteínas previamente digeridas (DEVLIN, 2011; BERG; STRYER; TYMOZKO, 2007).

Além disso, a tripsina também é responsável pela ativação de outras enzimas envolvidas nos processos metabólicos, como a conversão do

quimotripsinogênio em quimotripsina, a ativação da elastase pancreática e das carboxipeptidases A e B (DEVLIN; TOMA 2007).

A estrutura tridimensional da tripsina consiste em duas alfa-hélices e dois barris-beta com seis fitas cada um deles (figura 5), nos quais se encontra a sua tríade catalítica serina (Ser), histidina (Hist) e Aspartato (Asp). Além disso, sua cadeia polipeptídica é composta por dois outros sítios: um de reconhecimento do substrato aspartato (Asp), Glycina (Gly) e (Gly); um de ligação ao íon cálcio glutamina (Glu), asparagina (Asn), valina (val), glutamina (Glu) e (Glu) e um de autólise formado por arginina (Arg) e lisina (Lis) (BODE e SCHWAGER, 1975; KISHIMURA, 2008).

Figura 5: Estrutura geral da tripsina

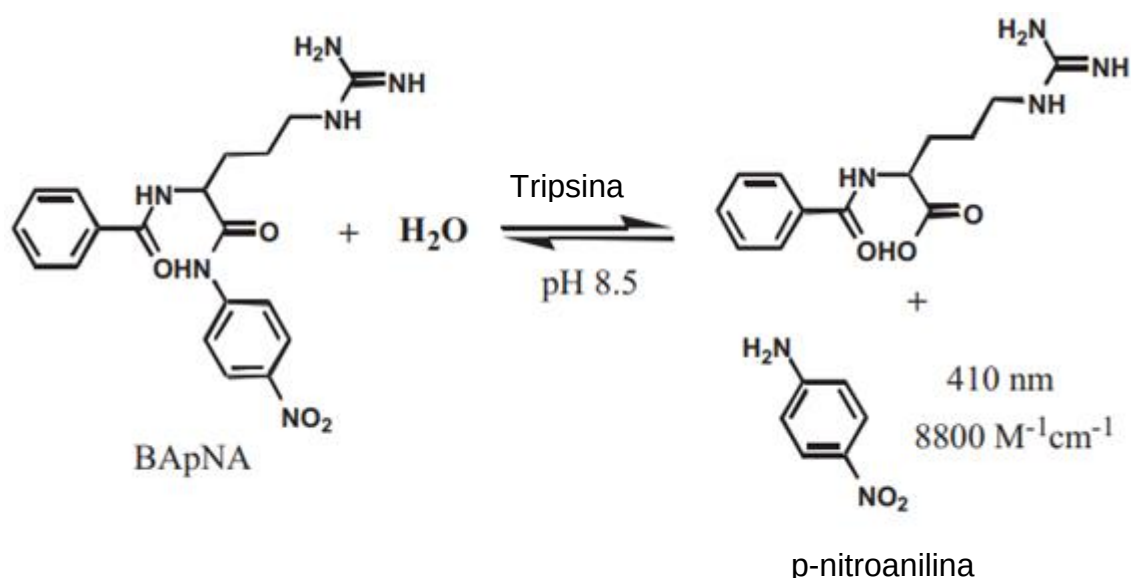


Fonte: SHRODER LEIROS et al, 2000

Para saber se uma determinada enzima de interesse está presente uma amostra é necessário algum método que possibilite sua detecção de forma específica. Um dos métodos utilizados em atividades enzimáticas é o uso de substratos cromogênicos, que são moléculas que mimetizam os substratos naturais das enzimas e, que ao serem clivados, liberam grupos que podem ser detectados devido a uma mudança de cor. A atividade tripsínica é determinada usando o substrato sintético, N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida (BApNA). O

BAPNA é formado por um agente cromóforo, p-nitroanilida (pNA), ligado covalentemente a um aminoácido. Em solução é incolor, mas quando se aplica a tripsina ao meio reacional, a mesma interage com o grupo carbonila do substrato cromogênico, como ilustrado na Figura 6, liberando o grupo p-nitroanilida, que absorve luz no comprimento de onda em torno de 410 nm, enquanto emite a cor amarela na solução enzimática, como resposta positiva à presença da enzima (ERLANGER et al., 1961).

Figura 6 - reação de hidrólise do BAPNA catalisada pela tripsina.



Fonte: HINTERWIRTH et al, 2012.

A tripsina, por estar envolvida em diversos processos metabólicos de diversos seres vivos, pesquisas destinadas ao isolamento e caracterização dessas enzimas tem crescido de forma vertiginosa. Além da purificação, estudos mais detalhados puderam determinar importantes características em relação à sua estrutura primária, uma grande elucidação referentes a suas atividades, assim como estudos destinados aos processos catalíticos desta enzima (SANTOS, 2020).

2.11 *Leucaena leucocephala*

O gênero *Leucaena* é atribuída aos indivíduos vegetais que estão inseridos na família *Fabaceae* e subfamília *Mimosoidae* com um número descrito em 32 espécies. A *Leucaena leucocephala* (Lam.), *Acacia leucocephala* (Lam.), *Mimosa leucocephala* (Lam) e *Leucaena glabata* (Rose) são os membros mais expressivos desse gênero (PANDEY e KUMAR, 2013). *L. leucocephala* é uma planta nativa da região central das Américas, especificamente, originária do estado mexicano Yucután, na Península do México. Posteriormente, foi disseminada em diversas partes do globo, incluindo África, Ásia, Oriente Médio, Ásia Indiana, América e Australásia (HOLM et al, 1979). No Brasil, a espécie *L. leucocephala* foi introduzida em meados da década de 1940, com o nome popular de leucena, no intuito de fornecer madeira, forragem e restaurar áreas degradadas (ALVES et al., 2014; FRANCO e SOUTO, 1986).

Definitivamente, a variedade morfológica e ecofisiológica dentro do gênero foi estabelecido com grande capacidade de cruzamento entre espécies e, proveniente de uma ampla variedade de aperfeiçoamento genético; ocorrido de forma reprodutiva de modo natural e, também via hibridização artificial interespecífica, assim como o desenvolvimento genético melhorado das sementes (ABAIR et al, 2019).

A hibridização interespecífica possibilita aos melhoristas de plantas introduzir genes ausentes na espécie de interesse ou de agrupa genótipos de espécies diferentes, no intuito de produzir novos indivíduos, seguindo a seleção e melhoramento genético (BRUCNER, 2008). A hibridização programada aplicada no desenvolvimento de novas plantações de *Leucaena* foi realizada com as seguintes características: forragem com menos quantidade de mimosina, resistência a solos ácidos, tolerância ao frio, maior produção de polpa seguido a relação madeira/biomassa, resistente a psíldeo e esterilidade (DALZELL, 2019).

O desenvolvimento ótimo da *L. leucocephala* ocorre em locais onde se quantificam uma média anual de aproximadamente 1500 mm de chuva, com estações secas de quatro meses (VAN DEN BELDT e BREWBARKER, 1985) e, médias anuais de temperaturas entre 25° C a 30° C (ALLEN e ALLEN, 1981). É importante frisar que o gênero *leucaena* possui tolerância a uma ampla

variedades de solos (National Academy of Sciences, 1980) o melhor crescimento acontece em direção a luz solar em solos bem drenados, moderadamente alcalinos (pH 7.5) ou em solo levemente ácido (pH 6,0), com baixa salinidade (TOMAR e GUPTA, 1985).

Leucena é uma árvore arbustiva sem espinho, com altura que chegam a atingir até 8m de altura e raízes profundas. As folhas são salteadas, bipinadas com 25 cm de comprimento com 12 a 18 pares de minúsculas folhas, de pedúnculo curto, contínuos ou contínuos oblongos, agudos, de cores opacas verde-acinzentadas, lisas, de 10-15 mm por 3-4 mm de largura, figura 7 F. As flores são diversas, de branco a branco amarelado, com o formato de cabeças globosas axilares, figura 7 A (LIM, 2012).

A fruta é uma vagem com aparência de tira delgada, com 12-14 cm de comprimento por 1,5 cm de largura. Quando jovem, apresenta cor verde clara, posteriormente adquire cor marrom e seca quando atinge a maturidade, contendo de 15-30 sementes, figuras 7 C e D. As sementes são normalmente ovais-oblongas, delgadas, de 6 a 10 mm de comprimento, vividamente verdes quando imatura e apresentado cor marrom-escura quando madura, figuras 2 B e C (LIM, 2012). Normalmente, as flores e os frutos estão presentes nas arvores em diversas fases de desenvolvimento ao mesmo tempo (PANDEY E KUMAR, 2013).

A *L. leucocephala* é também conhecida como árvore milagrosa, devido a diversos benefícios da utilização de suas partes. É utilizada na forragem, madeiramento e alimentação (ZAYED et al, 2018). Animais ruminantes que foram alimentados com *L. leucocephala* apresentaram aumento na produção de leite e melhor desenvolvimento, e consequente ganho de massa corpórea (NUGROHO et al, 2019). Diversas partes da planta pode ser utilizada na alimentação humana. As vagens jovens são cozidas como vegetais e as sementes são torradas e usadas como substituto do café nas Filipinas (ZAYED et al, 2016).

Figura 7: Descrição de diferentes partes da planta *Leucaena leucocephala*.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024

Em relação ao seu valor nutricional, A leucena é uma importante fonte de proteínas e β -caroteno. Além disso também é rica em aminoácidos essenciais como, arginina, alanina, cisteína, ácido glutâmico, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina e histidina. Essa planta é uma relevante fonte mineral, como cálcio, fósforo e outros disponíveis dependendo da disponibilidade no solo (D'MELLO e THOMAS, 1977; SCAPINELLO et al, 2000; VIETMEYER et al, 1977; FIGUEREDO et al, 2019; LOU et al, 2019; VERMA et al, 2018). As sementes também são ricas em lipídios tendo como principais componentes os ácidos palmíticos, esteáricos, beênico, lignocérico, oleico e linoleico (DIJKIMAN, 1950; NEHDI et al, 2014) e, elas também são usadas como vermífugos (ADEMOLA e IDOWU, 2006; ATHANASIADOU et al, 2001). As folhas são ricas em proteínas

e possuem 3% de taninos, caroteno, mimosina, 3-4% de flavonol glicosídeos, 18,6% de carboidratos totais, 1% de amido, 2,8% de oligossacarídeos totais, 4,2% de açúcares redutores, 1,2% de sacarose e 0,6% de refinose (LOWRY et al 1984; KALE, 1987; SINGH et al, 2014).

Apesar de a leucena possuir muitos constituintes nutricionais que são benéficos para a saúde, ela também contém um aminoácido tóxico não proteico (β -[N-(3-hidroxi-4-piridona)]- α -ácido aminopropiônico) estruturalmente mais semelhante ao DOPA do que à tirosina ou fenilalanina, conhecido como mimosina (HEGARTY et al, 1964; THOMPSON et al, 1969). Devido às forças intermoleculares possui um alto valor de ponto de fusão (227° C-228° C) (MOSTAD et al., 1973). Há diversos trabalhos reletando os aspectos referentes à química, biossíntese, regulação e degradação da mimosina (NGUYEN e TAWATA, 2016).

Diversos grupos de pesquisa têm trabalhado em soluções que implementam o uso da leucena e superam suas limitações devido à presença de mimosina. As folhas podem ser submetidas a tratamento térmico por calor ou temperatura com consequente redução significativa na concentração de mimosina (HEGARTY et al, 1964; AKBAR e GUPTA, 1984; BERGE e CURRAN, 1981; CHANCHAY e POOSARAN, 2009).

Além disso, acredita-se que o processo de cozimento ou imersão da planta em água quente, assim como o tratamento em autoclave, são mais eficientes que o uso de calor seco (WEE e WANG, 1987; KALE, 1987; SETHI, 1989; MALI et al, 1990; TER MEULEN, 1979). Estudo com método de ensilagem demonstrou ser eficiente na remoção de mimosina (CHEN et al, 2014; PHESATCHA e WANAPAT, 2016). A remoção de mimosina também pode ser realizada com o uso de acetato de sódio 0,05N ou ureia e bicarbonato de sódio, capazes de extrair altas porcentagens deste aminoácido de até 80% e 88%, respectivamente (HOSSAIN et al, 1991; HOGO et al, 1988). Outra possibilidade é a criação de híbridos de leucena modificados geneticamente o que possibilita a produção de espécies com baixos índices de mimosina (TAGENDJAJA et al, 1984).

Além da sua importância como fonte alimentar, a leucena também possui propriedades medicinais. A casca e as raízes são usadas na medicinal

comunitária e as raízes tem propriedades emenagógicas e abortivas (STANDLEY, 1922). Os componentes fotoquímicos podem ter usos potenciais nutracêuticos, como antidiabéticos (MEENA DEVI et al, 2013; CHOWTIVANNAKUL et al, 2016; WAN NADILAH et al, 2019); anticâncer; antimetastático (SHE et al, 2017) antibacteriano (ROSIDA et al, 2018) e anti-helmíntico (WAN NADILAH et al, 2019).

Foi descrita que a goma da casca de *L. leucocephala* pode ser utilizada como desintegrante na formulação de comprimidos e também usada na fabricação de papel (LOPEZ et al, 2008). Pode também ser usada na fitorremediação e revegetação de locais degradados e áreas contaminadas (LINS et al 2006).

Diferentes grupos de pesquisa ao longo do últimos anos, tem contornado as limitações do uso de mimosina devido a sua toxicidade e, descobriu-se que esse metabólico secundário possui diversas aplicações terapêuticas, tais como atividades anticancerígenas, anti-enflamatórias, anti-fibrose, anti-influeza, anti-vírus, atividade herbicidas e inseticidas. Além disso, a mimosina é alvo na produção de inibidores específicos da quinase 1 ativada por RAC/CDC42 (PAK1) para a terapia de diversas doenças/distúrbios, porquer PAK 1 não é relevante para o crescimento de células normais. Há relatos de aplicação de mimosina no tratamento de glioma malignos, na odontologia regenerativa e na fitorremediação (NGUYEN e TAWATA, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a atividade enzimática da serino protease presente no extrato bruto das sementes da *L. leucocephala* e avaliar a possível aplicação como um novo coagulante de leite.

3.2 Objetivos específicos

- Identificação taxonômica da espécie;
- Determinar a atividade proteolítica no extrato bruto;
- Avaliar o efeito da maturação das sementes na atividade proteolítica;
- Avaliar a influência da temperatura e do pH na atividade proteolítica;
- Realizar teste de inibição;
- Avaliar a influência de íons metálicos, solvente orgânico e detergentes na atividade proteolítica
- Avaliar a atividade coagulante do extrato bruto em preparações de leite bovino desnatado;
- Determinar o efeito da temperatura na coagulação do leite;
- Determinar o efeito da concentração de proteínas na coagulação do leite;
- Determinar o efeito dos íons Ca^{2+} na coagulação do leite;
- Determinar o efeito do tempo na coagulação do leite;

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção das sementes e Identificação da espécie *L. leucocephala*

As sementes foram coletadas da leguminosa *L. leucocephala* encontrada na Universidade Federal de Alagoas, no Campus A. C. Simões, localizada na cidade de Maceió/AL (Latitude: - 9,5573 e Longitude: - 35,77411). Após a autorização de coleta/transporte de material botânico concedido pelo Sistema de Autorização e informação de Biodiversidade (SISBIO) do Ministério do Meio Ambiente do Brasil sob o número 81042, no mês de dezembro 2019. O material foi acondicionado em embalagens lacradas e conduzidas ao Laboratório de Bioquímica Metabólica - LBM, vinculado ao Instituto de Ciências Farmacêuticas - ICF da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, para realização das análises.

Após a coleta das sementes necessárias para realização das análises iniciais, separou-se uma amostra da espécie vegetal para testes de identificação e disposição de exemplar no repositório do Herbário MAC do Instituto do Meio Ambiente (IMA) do Estado de Alagoas. A planta selecionada apresentava todas as suas estruturas morfológicas (caule, vagem, folhas e flores) necessárias para o processo de identificação, com o número de tombamento 65104.

Para o desenvolvimento da pesquisa, essa foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) do Ministério do Meio Ambiente do Brasil sob o número de cadastro AE02540.

4.2 Preparo do extrato bruto das sementes *L. leucocephala*

Para o preparo do extrato bruto da espécie *L. leucocephala* foram selecionadas sementes em diferentes estágios de maturação. As sementes foram pesadas separadamente em balança semi-analítica (Shimadzu BL320H) (17,5g) e posteriormente trituradas a seco em liquidificador semi-industrial. Em seguida 10g de pó foi colocado contra 30mL do tampão Tris – HCl, 50mM, pH 8,0. Para esse procedimento o material foi agitado numa placa agitadora magnética durante 24h em baixa rotação a 4,0°C, para possibilitar uma maior integridade estrutural das proteínas extraídas das sementes. Ao término do

procedimento, o material particulado foi centrifugado em 10.000 rpm por 15 min para separação de partículas insolúveis e, o sobrenadante empregado nas demais análises experimentais.

4.3 Ensaios enzimáticos

4.3.1 Efeito de diferentes substratos na atividade proteolítica do extrato bruto da espécie *L. leucocephala*

Como forma de confirmação da presença de enzimas proteolíticas no extrato bruto obtido a partir das sementes da planta *L. leucocephala*, realizou – se um ensaio enzimático com diferentes substrato: BApNA (N-a-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilida), SAAPFpNA (N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida), SAAPLpNA (N-succinil-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilide). O BApNA, SAAPFpNA e SAAPLpNA foi preparado separadamente em DMSO na concentração de 50mM. Nessa reação, um dos produto da hidrolise do BApNA, SAAPFpNA e SAAPLpNA é o *p*-nitroanilida, em que a cor amarela é analisada a 410nm.

Em cada reação enzimática 8 µg/mL de extrato bruto enzimático foi adicionado a 110µL de tampão (Tris-HCl, pH 8.0, 50mM) com 30µL de solução reveladora. A reação foi realizada a 37°C e o tempo de incubação foi de 60min. Para finalização do experimento, utilizou – se a adição 150µL de ácido cítrico a 20% (m/v). A atividade enzimática foram determinada pela formação do produto *p*-nitroanilida, através da medida de absorbância a 410nm. Utilizando-se para cálculos de atividade o coeficiente de extinção molar de $8800\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ para o *p*-nitroanilida (BUDATHA et al, 2008).

A solução reveladora contendo BApNA é composta por 4µL de BApNA 50mM + 96µL de tampão Tris-HCl, pH 8.0, 50mM. A solução reveladora contendo SAAPFpNA é composta por 4µL SAAPFpNA a 50mM + 96µL de tampão Tris-HCl, pH 8.0, 50mM. Assim como, a reação com SAAPLpNA é formado por 4µL SAAPLpNA a 50mM + 96µL de tampão Tris-HCl, pH 8.0, 50mM.

4.3.2 Efeito da concentração do extrato bruto da espécie *L. leucocephala* na hidrólise do substrato BApNA (N-a-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide).

Neste ensaio, a atividade enzimática foi avaliada em função da concentração de proteínas presente no extrato bruto. Em cada reação enzimática diferentes concentração de proteínas (0.4µg/mL, 2µg/mL, 4µg/mL, 6µg/mL, 8µg/mL) foram adicionado a 110µL de tampão Tris-HCl, 50mM, pH 8.0 com 30µL de solução reveladora (4µL de BApNA a 50mM + 96µL de tampão Tris-HCl, 50mM, pH 8.0). A reação foi realizada a 37°C e o tempo de incubação foi de 60min. Para finalização do experimento, utilizou – se a adição 150µL de ácido cítrico a 20% (m/v). A atividade enzimática foram determinada pela formação do produto *p*-nitroanilida, através da medida de absorbância a 410nm. Utilizando-se para cálculos de atividade o coeficiente de extinção molar de 8800M⁻¹.cm⁻¹ para o *p*-nitroanilida.

4.3.3 Efeito da maturação das sementes da espécie *L. leucocephala* na atividade proteolítica

Como forma de avaliar o efeito da maturação das sementes na atividade enzimas proteolíticas, realizou – se protocolo experimentais de forma a comparar as sementes de *L. leucocephala* em diferentes estágios de maturação, as quais foram chamadas como sementes verdes e sementes maduras. Para esse procedimento, foi necessário a obtenção de novos extratos, com sementes previamente selecionadas. Para o preparo dos extratos, 8,5g de sementes maduras e 8,5g de sementes verdes foram pesadas em balança semi-analítica (Shimadzu BL – 320H) e preparadas separadamente. As sementes foram trituradas utilizando tesoura, graal e pistilo. Em seguida, submetida a agitação em tampão de extração Tri- HCl 50 mM pH 8,0 (30 mL) por 24h. O homogenato foi centrifugado durante 15 min por 10.000 rpm e, o sobrenadante final foi usado nas análises experimentais. A reação foi iniciada pela edição do substrato e a atividade determinada como descrito no item 4.3.1, para o substrato BApNA.

4.3.4 Efeito do tempo de incubação na atividade proteolítica do extrato bruto da espécie *L. leucocephala*.

O efeito do tempo de incubação na atividade enzimática foi determinado no período de 10, 20, 30, 40, 50 e 60min. A reação foi iniciada pela adição do substrato e o tempo de incubação ocorreu como descrito anteriormente, a atividade enzimática foi determinada como descrita no item 3,4,1 para o substrato BApNA.

4.3.5 Efeito da temperatura ótima e estabilidade térmica na atividade proteolítica do extrato bruto da espécie *L. leucocephala*.

Para verificar a temperatura ótima da atividade enzimática do extrato obtido das sementes de *L. leucocephala* foi determinado em diferentes intervalos de temperaturas: 10° C, 20° C, 30° C, 40° C, 50° C, 60° C e 70° C. A reação foi iniciada pela edição do substrato e a temperatura de incubamento ocorreu como descrito anteriormente e, a atividade foi determinada como descrito no item 4.3.1, para o substrato BApNA.

A estabilidade térmica foi analisada inicialmente encubando a enzima em diferentes temperaturas 10° C, 20° C, 30° C, 40° C, 50° C, 60° C e 70°C, por 60min, após o período de incubação, a reação foi iniciada pela adição do substrato e a atividade enzimática foi determinada como descrita no item 3,4,1 para o substrato BApNA.

4.3.6 Efeito do pH ótimo e estabilidade em pH na atividade proteolítica do extrato bruto da espécie *L. leucocephala*.

Para determinação do pH ótimo, foi avaliado o tamponamento com maior atividade enzimática do extrato obtido das sementes da *L. leucocephala*. Os sistemas tampões escolhidos foram: ácido acético (pHs 4 e 5), ácido fosfórico (pHs 6, 7, 11 e 12), Tris – HCl (pH 8,0) e glicina (pHs 9 e 10) todos na concentração de 100mM. Em cada reação enzimática 8 µg/mL de extrato bruto enzimático foi adicionado a 110µL de tampão anteriormente descrito com 30µL de solução reveladora (4µL de BApNA a 50mM + 96µL de tampão Tris-HCl, 50mM, pH 8.0). A reação foi realizada a 37°C e o tempo de incubação foi de

60min. Para finalização do experimento, utilizou-se a adição 150µL de ácido cítrico a 20% (m/v). A atividade enzimática foi determinada pela formação do produto *p*-nitroanilida, através da medida de absorbância a 410nm. Utilizando-se para cálculos de atividade o coeficiente de extinção molar de 8800M⁻¹.cm⁻¹ para o *p*-nitroanilida.

A estabilidade em pH foi analisada com os mesmos tampões descritos acima, inicialmente 8 µg/mL do extrato bruto enzimático é incubado com 50µL dos respectivos tampões acima citados por 60min, após o período de incubação foi adicionado 100µL de tampão do pH ótimo (glicina 100mM, pH 9,0) e 30µL de solução reveladora (4µL de BApNA a 50mM + 96µL de tampão Tris-HCl, 50mM, pH 8.0), a reação foi novamente incubada por 60min e encerrada com 150µL de solução de ácido cítrico a 20%(m/v). A atividade enzimática foi determinada pela formação do produto *p*-nitroanilida, através da medida de absorbância a 410nm. Utilizando-se para cálculos de atividade o coeficiente de extinção molar de 8800M⁻¹.cm⁻¹ para o *p*-nitroanilida.

4.3.7 Efeito de diferentes inibidores na atividade proteolítica do extrato bruto da espécie *L. leucocephala*

A ação catalítica de protease presente no extrato bruto das sementes da espécie *L. leucocephala* foram avaliados na presença de diferentes inibidores: Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF) (5mM), 2 – Mercaptoethanol (5mM), Dithiothreitol (DTT) (5mM), Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) (5mM), Benzamidina (5mM) e Soybean trypsin Inhibitors (SBTI) (1mg/mL). Neste ensaio, 8 µg/mL de extrato bruto enzimático foi incubado com os inibidores por 30min na temperatura ambiente, após esse período de incubação a atividade enzimática foi determinada como descrita no item 3,4,1 para o substrato BApNA.

4.3.8 Efeito dos íons metálicos na atividade proteolítica do extrato bruto da espécie *L. leucocephala*

A atividade catalítica de protease presente no extrato bruto das sementes da espécie *L. leucocephala* foi analisada quanto a influência de íons metálicos:

Na^+ , K^+ , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} na concentração de 10mM. Nas reações enzimáticas foram adicionados de 8 $\mu\text{g/mL}$ extrato bruto enzimático, 50 μL de solução de metais, 60 μL de tampão glicina 100mM, pH 9.0. A reação foi encubada por 30min, após este tempo decorrido foi adicionado 30 μL de solução reveladora (4 μL de BApNA a 50mM + 96 μL de tampão Tris-HCl 50mM, pH 8.0) e encubada por 60min a 40C° e, encerrada com 150 μL de solução de ácido cítrico a 20%(m/v). A atividade enzimática foram determinada pela formação do produto *p*-nitroanilida, através da medida de absorbância a 410nm. Utilizando-se para cálculos de atividade o coeficiente de extinção molar de 8800M⁻¹.cm⁻¹ para o *p*-nitroanilida.

4.3.9 Efeito dos solventes orgânicos na atividade proteolítica do extrato bruto da espécie *L. leucocephala*

A atividade enzimática presente no extrato bruto das sementes da espécie *L. leucocephala* foi analisada quanto a influência de solventes orgânicos: metanol, etanol, isopropanol, tec-butanol, DMSO, propanona, acetonitrila. Todos os solventes orgânicos estavam na concentração de 50% (v/v). Nas reações enzimáticas foram adicionado 8 $\mu\text{g/mL}$ de extrato bruto enzimático, 50 μL de solvente orgânico e 70 μL de tampão glicina 100mM, pH 9.0. A reação foi encubada por 30min. Após passado esse período de tempo, foi adicionado 30 μL de solução reveladora (4 μL de BApNA a 50mM + 96 μL de tampão Tris-HCl, 50mM, pH 9.0) e encubada por 60min a 40° C. A reação foi finalizada com 150 μL de ácido cítrico a 20% (m/v). A atividade enzimática foram determinada pela formação do produto *p*-nitroanilida, através da medida de absorbância a 410nm. Utilizando-se para cálculos de atividade o coeficiente de extinção molar de 8800M⁻¹.cm⁻¹ para o *p*-nitroanilida.

4.3.10 Efeito dos detergentes na atividade proteolítica do extrato bruto da espécie *L. leucocephala*

A atividade enzimática presente no extrato bruto das sementes da espécie *L. leucocephala* foi analisada quanto a influência de detergentes: tween 40,

tween 80 e triton x – 100. Os detergentes foram testados nas concentrações de 0,1%, 1% e 10%(m/v), respectivamente. Nas reações enzimáticas foram adicionado 8 µg/mL de extrato bruto enzimático, 110µL de solução detergente (detergente + tampão glicina 100mM, pH 9.0). A reação foi encubada por 30min. Após passado esse período de tempo, foi adicionado 30µL de solução reveladora (4µL de BApNA + 96µL de tampão glicina 100mM, pH 9.0) e encubada por 60min a 40C°. A reação foi finalizada com 150µL de ácido cítrico a 20% (m/v). A atividade enzimática foram determinada pela formação do produto *p*-nitroanilida, através da medida de absorbância a 410nm. Utilizando-se para cálculos de atividade o coeficiente de extinção molar de 8800M⁻¹.cm⁻¹ para o *p*-nitroanilida.

4.4 Teste de coagulação de leite desnatado

4.4.1 Efeito do período de encubação na atividade coagulante do leite em pó reconstituído pelo extrato bruto das sementes da espécie *L. leucocephala*

A investigação da atividade coagulante do extrato enzimático das sementes de *L. leucocephala* foi analisada no período (60, 120, 180, 240, 300 e 360min) necessário para formação do coágulo na solução de leite bovino em pó 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% (m/v), contendo 10mM de cloreto de cálcio e, o pH ajustado para 6.5 com HCl a 5M. Para os ensaios de coagulação foram tomadas alíquotas de 500µL de leite em pó desnatado reconstituído, distribuídos em triplicatas, os quais foram mantidos por 10 min a 37°C e 50C° em banho maria. Em seguida, adicionou-se 0,1mg/mL de extrato bruto enzimático à solução de leite e incubou novamente o meio reacional a 37C° e 50C°. Posteriormente, a reação foi centrifugada por 2min a 10.000 rpm, onde foi observado o momento exato em que acontecia a total coagulação do leite.

4.4.2 Efeito da concentração proteica na atividade coagulante do leite em pó reconstituído pelo extrato bruto das sementes da espécie *L. leucocephala*

Como forma de avaliar o efeito da concentração enzimática do extrato bruto das sementes da espécie *L. leucocephala* na coagulação de leite em pó reconstituído, realizou-se ensaio enzimático em diferentes concentrações proteicas (0,00312mg, 0,00625mg, 0,0125mg, 0,025mg, 0,050mg e 0,1mg/mL) do extrato bruto. A solução de leite foi preparada com leite em pó desnatado a 10% (m/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 500µL de leite em pó desnatado reconstituído, distribuídos em triplicatas, os quais foram mantidos por 10min por 50C° em banho maria. Em seguida, adicionou-se concentrações acima descrita de extrato proteico e incubou por 180min a 50C°. Posteriormente, a reação foi centrifugada por 2min a 10.000 rpm, onde foi observado a total formação do coágulo de leite.

4.4.3 Efeito da concentração do cálcio na atividade coagulante do leite em pó reconstituído pelo extrato bruto das sementes da espécie *L. leucocephala*

Como forma de avaliar o efeito da concentração de cálcio na atividade coagulante de leite do extrato bruto das sementes da espécie *L. leucocephala*, realizou-se ensaio enzimático em diferentes concentrações de cálcio (2mM, 4mM, 6mM, 8mM e 10mM). A solução de leite foi preparada com leite em pó desnatado a 10% (m/v), sem a presença de cloreto de cálcio e, o pH ajustado para 6.5 com HCl a 5M. Para os ensaios de coagulação foram tomadas alíquotas de 500µL de leite em pó desnatado reconstituído, distribuídos em triplicatas, os quais foram mantidos por 10min por 50C° em banho maria. Em seguida, adicionou-se 0,1 mg/mL de extrato bruto enzimático mais concentrações acima descrita de cloreto de cálcio e incubou por 180min a 50° C. Posteriormente, a reação foi centrifugada por 2min a 10.000 rpm, onde foi observado a total formação do coágulo de leite. No ensaio enzimático as amostra sem cloreto de cálcio foi tomado como controle negativo.

4.4.4 Teste de coagulação de leite integral pasteurizado pelo extrato bruto das sementes da espécie *L. leucocephala*

As mesmas condições imposta no experimento realizado com o leite em pó desnatado bovina foram reproduzida com leite integral pasteurizado, em que o pH foi ajustado para 6.5 e, adicionado cloreto de cálcio a 10mM. Para os ensaios de coagulação foram tomadas alíquotas de 500µL de leite integral pasteurizado, distribuídos em triplicatas, os quais foram mantidos por 10min por 50° C em banho maria. Em seguida, adicionou-se 0,1mg/mL de extrato enzimático e encubou por 180min a 50° C, onde foi observado a total formação do coagulo de leite.

4.4.5 Efeito da estabilidade térmica

A Enzimas são macromoléculas formadas por ligações pépticas que podem sofrer mudança conformacional com perda da atividade catalítica, devido a alguns fatores, dos quais enfatizamos alterações rápidas na temperatura. Devido a isto, optamos por reproduzir estas análises no processo de coagulação do leite, em que 0,2mg/mL extrato bruto foi distribuído em duplicata e previamente aquecido por 15min a 100°C, com o intuito de provocar perda da ação catalítica (desnaturação) da enzima. No controle positivo, utilizou-se 0,2mg/mL de extrato bruto também distribuído em duplicata que não foi aquecido previamente. A solução de leite foi preparada com leite em pó desnatado a 10% (m/v), contendo 10mM de cloreto de cálcio e, o pH ajustado para 6.5 com HCl a 5M. Para os ensaios de coagulação foram tomadas alíquotas de 1000µL de leite em pó desnatado reconstituído, os quais foram mantidos por 10min por 37° C em banho maria e seguida incubou com as amostras por 360min a 37° C.

4.5 Eletroforese SDS-PAGE

As eletroforeses foram realizadas a voltagem constante, em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12 e 15%, usando 5% e 12% (m/v) para os géis de empilhamento e separação respectivamente (LAEMMLI, 1970). Ao fim, o gel foi mergulhado em 0.2% Coomassie Brilliant Blue

G-250 em H₂O: Metanol (1:1), e posteriormente lavado com solução descorante (50% metanol e 10% ácido acético).

4.6 Cálculo da atividade coagulante

Para o cálculo da atividade foi levada em consideração a subsequente equação: MCA (U/ml) = [(2400xV)/t]xv. Em que “V” é o volume do leite em mL, “refere – se ao tempo de coagulação em segundo e “v” é o volume da extração enzimática usadas em mL

4.7 Determinação da concentração da proteína *L. leucocephala*

A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro Bovino como padrão. Para isso foram tomados 10µL das amostras, adicionados 190 µL de reagente de Bradford. Posteriormente as amostras foram incubadas por 5 min, e medido a absorbância a 595 nm. As unidades correspondentes são (mg/mL) de proteínas.

4.8 Cálculos de unidades enzimáticas

A atividade amidase, hidrólise do BApNA, SAAPFpNA, SAAPLpNA, foi calculada de acordo com a fórmula abaixo, onde 8800 M⁻¹ cm⁻¹ é o coeficiente de extinção do p-nitroanilina; A e A₀ são as absorbâncias das amostras e do branco, respectivamente, lidas em espectrofotômetro a 410nm.

$$\text{Atividade (U/mL)} = \frac{(A - A_0) \times \text{volume final da mistura (mL)} \times 1000}{8800 \times \text{tempo de reação (min)} \times 0,2 \text{ (mL)}}$$

4.9 Análise estatística

Os gráficos foram plotados utilizando o software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc, San Diego). Todos os dados são expressos como média ± média do erro padrão. A comparação entre os grupos foi realizada pela

análise de variação (ANOVA). Os níveis de significância foram de 0,05 e os valores de *p* são indicados nas legendas das figuras.

5. Ensaio de toxicidade com bioindicador

5.1.1 *Artemia salina*

A *Artemia salina*, crustáceo que se desenvolve em ambientes com alto teor de sais foi selecionado para os ensaios de ecotoxicidade por ter diversos estudos descritos na literatura (KUMAR et al, 2016; CANSIA et al, 2017), onde foram adquiridos cistos de *A. salina* em loja especializadas em produtos para aquários e lavados ao Laboratório Eletroquímica Aplicada B (LEApB), para o experimento foi coletado água do mar oriunda da praia de Cruz das Almas, Maceió-AL.

A solução de água do mar foi previamente aerada durante 30 minutos e então realizada a incubação de 50 mg de cistos de *A. salina* por 48 horas em béquer, onde durante esse período os cistos foram mantidos em iluminação de 10 W (lâmpada de led), sendo realizado o controle de temperatura para manter a variação máxima entre 25° C a 30° C.

Foi coletado 10mL de solução contendo 100 ppm, 200 ppm, 500 ppm e 1000 ppm de extrato de sementes *L. leucocephala* em tubo de ensaios, em regime de quadruplicatas, assim como a realização de ensaios de grupos controles contendo água destiladas, NaCl 1 mg, 2 mg, 4 mg, 8 mg, 16 mg e Tris-HCl 50mM, pH 8.0 (tampão de extração).

Após a eclosão das larvas foram dispensados 10 larvas de *A. salina*, os quais permaneceram em contato com a solução durante o período de 24 horas. Após esse período, foi realizada a contagem de animais vivos e mortos expostos durante o bioensaio, sendo esse comparado com o um grupo controle que recebeu apenas 10mL de água do mar (ABNT, 2016) e tampão tris HCl pH 8.0 (tampão de extração). Foram considerados vivos os organismo que apresentaram movimento quando observados próximos à fonte de luminosa durante 10 segundos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Caracterização da atividade proteolítica do extrato bruto da *L. leucocephala*

6.1.1 Obtenção das sementes de *L. leucocephala*, preparo do extrato bruto e verificação da atividade enzimática.

A leucena é uma planta extremamente importante, já lhe tendo sido atribuída uma variedade de benefícios com uso de suas partes (ZAYDE et al, 2018). Em relação as sementes, apresentam em sua composição diversos metabólicos importantes para o desenvolvimento da planta (ANGELIS et al, 2021). Neste estudo, o extrato bruto foram preparado a partir de 10g de pó das sementes secas da *L. leucocephala* onde foi obtido 0.465 mg/mL de proteínas. E após a determinação da concentração proteína no extrato bruto, efetuou-se ensaios enzimáticos como forma de detecção da presença de proteases no material coletado.

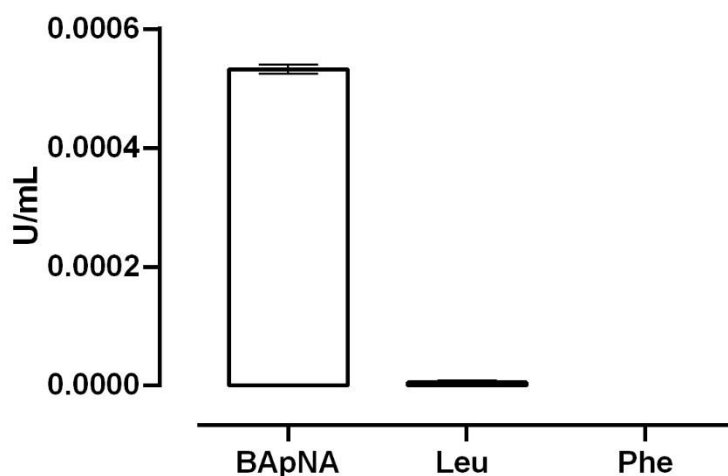
As reações enzimáticas são extremamente importantes para atividade biológica de qualquer organismo vivo e a natureza dessas reações se deve alguns fatores, como cinética reacional e especificidade entre as enzimas e seus substratos (SOUZA et al, 2013). E devido a essa seletividade é possível também classificar a classe da enzima que estamos trabalhando a partir das sementes *L. leucocephala*. Então realizou-se ensaio enzimáticos com diferentes substratos peptídicos sintéticos BApNA, SAAPFpNA e SAAPLPNA (ALICE e ARABACI, 2018).

Como pode ser observado na figura 8, a enzima presente no extrato bruto da sementes *L. leucocephala* mostrou seletividade catalítica apenas para o BApNA o que atesta que a enzima presente no extrato apresentou especificidade pelo resíduo de arginina, ao que indica que enzima pertence à classe das serino protease, endopeptidase que conserva em seu sitio catalítico a presença dos aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico. Já em relação aos outros substratos sintéticos SAAPFpNA e SAAPLPNA não demonstrou atividade.

Alice e Arabaci (2018) purificaram uma protease proveniente do morango *Fragaria ananassa* em que demonstrou alta atividade catalítica para o BApNA,

SAAPFpNA e SAAPLpNA, assim como Singh et al, (2010) relataram que uma serino protease presente na planta *Crinum asiaticum* demonstrou atividade para SAAPFpNA e SAAPLpNA, mas não apresentou atividade catalítica para o BApNA. Rawaliya e colaboradores (2022) purificaram uma serino protease proveniente das sementes da *Cyamopsis tetragonoloba* que demonstrou atividade catalítica para o BApNA, mas não apresentou atividade enzimática para SAAPFpNA. Já o grupo experimental de Tomar e colaboardore (2008) relataram uma protease sérica presente no látex da planta *Wrightia tinctoria* (Roxb) R. Br. não apresentou atividade catalítica para o BApNA, SAAPFpNA e SAAPLpNA, preferindo hidrolisar unicamente resíduos de alaninas.

Figura 8 - Especificidade da protease do extrato *L. leucocephala*. As reações foram efetuadas em pH 8,0 em que o extrato enzimático foi submetido à incubação com os respectivos substratos.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

6.1.2 Caracterização da atividade enzimática no extrato bruto das sementes *L. leucocephala*

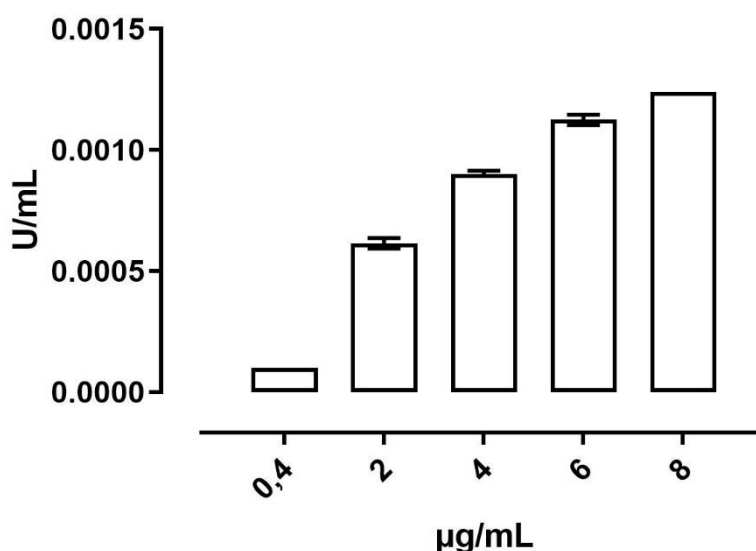
A caracterização das atividades enzimáticas foi proposta no intuito de conhecer sobre a biologia e funcionamento das serino proteases presente nas sementes da *L. leucocephala*. Na curva de concentração, onde diferentes concentrações do extrato proteico foram testadas contra a presença do substrato

cromogênico BApNA, foi observado aumento da atividade enzimática em função do aumento da concentração de proteínas do extrato em teste (Figura 9). Nesse caso, observa-se que a quantidade de p-nitroanilina liberada foi proporcional à quantidade de enzima adicionada. Santos (2020) descreveu resultados semelhantes ao testar a atividade de uma serino protease presente no extrato proteico das sementes da *Crotalaria stipularia*, confirmando o fato de que o extrato proteico funciona bem como fonte de enzimas e que as condições de incubação impostas são adequadas.

Além disso, resultados semelhantes foram descritos por Panicker e colaboradores (2009) usando uma serino protease purificada das sementes do *Cocos nucifera* L. e também por Wani e Mashuru (2014) em testes utilizando como fonte de enzima uma tripsina comercial.

As proteases de plantas tem sido citada na literatura por realizarem inúmeros papéis em diversos processos fisiológicos ao longo do desenvolvimento natural da planta, como morte celular programada, senescência, abscisão, amadurecimento dos frutos, crescimento da planta e homeostase de nitrogênio (GRUDKOWSKA e ZAGDANSKA, 2004; VAN DER HOOR, 2008; LIU et al, 2018; TORNKVIST et al, 2019). Para sobreviver a escassez de água, as plantas provocam mudanças nos padrões de expressão gênica, modificações estruturais e fisiológicas para melhorar a captação de água. A rápida degradação e renovação de proteínas é necessária para uma reciclagem eficaz de nutrientes. Sendo assim, Gomes-Sanches e colaboradores (2019) relataram a descoberta de quatro genes de regulação de enzimas pertencente à família da cisteína proteases, responsável pelo controle de estresse abiótico e biótico. A matrix extracelular de planta é a primeira barreira de proteção vegetal contra invasão de patógenos. Portanto, possui diversas proteases responsável pelo sistema imunitário. Godson e Van Der Hoorn (2021) relatam uma metanálise de 46 proteases presentes na matrix extracelular envolvidas na imunidade de plantas, nesta revisão eles também definiram seis vias bioquímicas pelos quais essas imunoproteases atuam.

Figura 9 – Avaliação da atividade enzimática do extrato das sementes *L. leucocephala* em função da concentração de proteínas diante da hidrólise do BApNA.



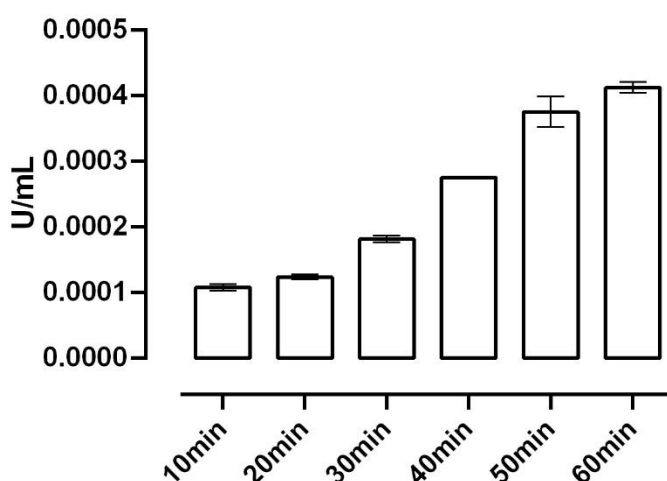
Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

Analizando a direta associação entre concentração enzimática e hidrólise do substrato BApNA, observou-se sob as mesmas condições, o efeito do tempo de incubação na formação do *p*-nitroanilina (Figura 10). De acordo com os resultados mostrados, podemos observar que tempo de incubação foi satisfatório para uma maior hidrólise do substrato em produto, e depois de 60 min, a enzima se manteve estável, apresentando maior unidades de atividade (0,00124U/mL), quando confrontado com os demais tempos da reação. Esse tipo de cinética química é preferível pela biotecnologia em relação a enzimas com aplicação industrial, pois garante uma maior eficácia catalítica do substrato, assim como assegura a disposição de enzima ativa por longos períodos de tempo.

A aplicação de extratos vegetais brutos contendo proteases com atividades biotecnológicas vem ganhando popularidade pela indústria de alimentos, devido ao menor custo, atributos sensoriais e compostos bioativos. O maior custo nos processos de separação e purificação de enzimas, natureza lábil

e baixa estabilidades dessas enzimas são alguns dos principais desafios encontrados pela indústria de alimentos. Asmi e colaboradores (2023) relataram em seus estudos novas tecnologias aplicadas a biocatalizadores não-purificados, no intuito melhorar a estabilidade e vida útil dessas enzimas, por meio de imobilização, encapsulamento, engenharia de proteínas, engenharia de meio e estabilização durante o processamento do alimento. Que resultaram numa melhor comercialização destes bioprodutos de elevado valor comercial. Paiva e colaboradores (2022) relataram que a produção de proteases é essencial para o segmento industrial e, que sua comercialização representa atualmente cerca de 60% das enzimas produzidas no mundo.

Figura 10 – Avaliação da atividade enzimática do extrato das sementes *L. leucocephala* em função da tempo diante da hidrólise do BApNA



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

6.1.3 Ensaio de Inibição enzimática

As enzimas são classificadas de acordo com a natureza bioquímica do mecanismo de ação que as mesmas possuem. E um dos métodos aceitos para identificar o mecanismo enzimático de uma enzima é através de experimentos com inibidores conhecidos (SEDMAN e GROSSBERG, et al, 1977). Na tabela 1 apresenta-se os resultados referentes atividade enzimática frente a inibidores específicos.

Tabela 1: inibidores utilizados frente a serino proteases da *L. leucocephala*

Inibidores		Concentração	% de inibição
PMSF		5mM	95,79
Benzamidina		5mM	84,22
2	–	5mM	30,72
Mercaptoetanol			
DTT		5mM	22,49
SBTI		1mg/mL	8,13
EDTA		5mM	12,89

Fonte: elaborado pelo autor, 2023

O inibidor de metaloprotease (EDTA), proteases de cisteína (2-Mercaptoetanol e DTT) apresentaram uma ligeira diminuição na atividade enzimática, mas não comprometeu o desempenho da enzima. A inibição parcial pelo 2-Mercaptoetanol e DTT pode ser explicado pelo fato da estrutura tridimensional da enzima ser estabilizada por ligações dissulfeto que se reduzem na presença de agentes redutores, diminuindo a atividade da enzima (SHARMA et al, 2012).

No entanto, a atividade enzimática foi consideravelmente inibida por PMSF, um inibidor clássico de serino proteases (BARRET, 2001). Seguido por Benzamidina um inibidor de serino protease do tipo tripsina (MARES – GUIA e SHAW, 1965), sugerindo a presença deste tipo de protease no extrato da *L. leucocephala*, mas é necessário mais testes para fortalecer essa hipótese, como a purificação e, também sequenciamento da estrutura primária da proteína.

A reação inibitória pelo PMSF ocorre pela ligação do grupo sulfonila a hidroxila da serina no sítio ativo enzima de forma irreversível por meio de uma ligação covalente e, liberando o flúor no meio (PERES et al, 2023). A benzamidina é inibidor sintético competitivo da tripsina e, quando presente no meio reacional, posiciona-se no sítio de especificidade da enzima, sítio S1, a estrutura molecular é estabilizada por interações hidrofóbicas no bolso

hidrofóbico, assim como por interações eletrostáticas, presente no grupo amidina do inibidor e um resíduo carboxila pertencente a um ácido aspártico localizado no interior do bolso S1 (CHÁVEZ, 2016).

Resultado semelhante foi relatada por Santos (2023) que observou atividade inibitória do PMSF (84,3%) e Benzamidina (74, 28%), no extrato enzimático das sementes da *Salvia hispânica* L. Gonçalves e colaboradores (2020) relataram que uma serino protease presente no legume *Canavalia ensiformes* foi completamente inibida por Benzamidina e TPCK.

Um inibidor proteico, como inibidor de tripsina de soja (SBTI) tipo Kunitz (SONG e SUN, 1998) que está presente em alimentos ricos em soja, não inibiu expressivamente a enzima. Esta característica poderia, portanto, possibilitar a aplicação desta enzima na indústria de alimentos (TOMAR et al, 2009). Normalmente, o inibidor de tripsina da soja inibe com sucesso a atividade de serino protease bacteriana ou animais, mas não inibe necessariamente proteases vegetais correlacionadas (UCHIKOBA et al, 1995; ARIMA et al, 2000). Embora as serino proteases sejam enzimas estruturalmente conservada, sua tríade catalítica pode sofrer ligeiras variações e tal modificação pode ser responsável pela falta de inibição pelo SBTI. Resultado semelhante foi relatado por Praxedes – Garcia e colaboradores (2012) que observou que uma serino protease purificada das sementes da *Caesalpinia echinata* foi parcialmente inibida por Benzamidina (50%), mas não ocorreu inibição por inibidores de serino protease (SBTI e PMSF).

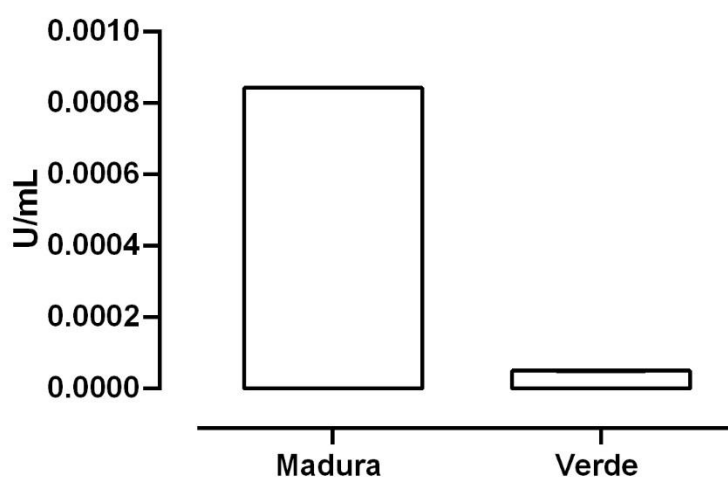
6.1.4 Efeito da Maturação das Sementes Sobre a Atividade Proteolítica do Extrato de *L. leucocephala*.

Como visto em diferentes espécies, as proteases de plantas atuam essencialmente na produção de aminoácidos livres a partir de moléculas proteicas mais complexas. A hidrólise de proteínas é um dos processos metabólicos mais importante relacionado a senescência, com papel essencial na remobilização de nutrientes, principalmente nitrogênio, para uso em outras regiões da planta, como órgão em desenvolvimento, sementes ou tecidos de armazenamentos. E esse processo é altamente dinâmico e envolve diversas

proteases localizadas em diferentes compartimentos celulares. As atividades das proteases são estritamente reguladas por controladores gênicos, inibidores específicos e pela ativação de zimogênios, no intuito de desenvolver sua atividade metabólica no lugar certo e no momento certo (DIAZ-MENDOZA et al, 2016; WANG et al, 2021).

Assim, realizou-se uma análise sazonal da atividade enzimática em diferentes estágios de desenvolvimentos das sementes, frente ao BApNA, onde pode ser observada na figura 11.

Figura 11: Atividade do extrato da *L. leucocephala* e efeito da sazonalidade na hidrólise do substrato BApNA. Os extratos brutos das sementes verdes e maduras foram preparados na mesma razão (w/v) e depois submetidos ao mesmo ensaio enzimático frente ao BApNA.



Fonte: elaborada pelo autor, 2023

O gráfico demonstra que a atividade enzimática é mais expressiva no final do desenvolvimento das sementes (sementes maduras), e este resultado, por sua vez, pode estar relacionado a atividade da enzima no processo de desenvolvimento e senescência, conforme observado anteriormente. Desta forma, podemos considerar que os relatos descritos por Diaz-Mendoza et al., (2016) e Wang et al., (2021) se aplicam espécie vegetal utilizada em nossos experimentos, de forma que a protease presente nas sementes da *L.*

leuchocephala estão atuando no desenvolvimento da planta, através da mobilização de aminoácidos livres e metabolização de estruturas mais complexas.

6.1.5 Ensaio de pH ótimo e estabilidade pH

O valor de pH no qual a atividade da enzima é máxima configura um critério muito relevante na sua caracterização, e em relação as proteases, sugere a classe e o tipo a qual essa enzima pertence. É conhecido que a faixa em que as serino proteases de plantas tem atividade máxima ocorre na faixa de pH levemente ácido a alcalino (TRONCOSO et al, 2022).

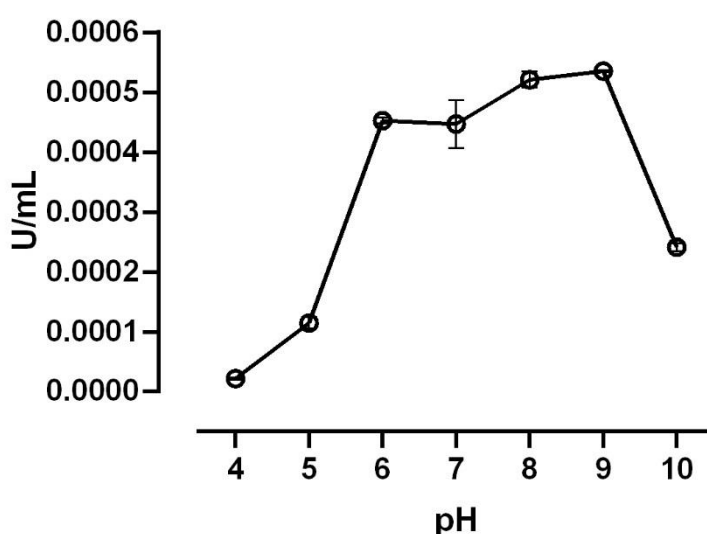
Na figura 12 observa-se que a serino protease apresenta uma baixa atividade em pHs ácidos 4.0 e 5.0, o que pode estar relacionado a provável desnaturação da molécula em meio ácido. A desnaturação enzimática é um processo pelo qual ocorre uma mudança estrutural na enzima impedido que a molécula realize sua função catalítica anteriormente desempenhada.

As enzimas pertencentes a classe das serino proteases tem como característica possuir uma tríade catalítica no seu centro ativo, formada pelo seguintes aminoácidos: Serina, Histidina e ácido Aspártico. Uma das etapas principais da reação catalítica está relacionada à atividade da histidina que reage como uma base de Lewis, retirando o próton do resíduo de serina. Deste modo, em condições ácidas (pHs 4.0 e 5.0) o resíduo de histidina se encontra na sua forma protonada, impedindo assim o ataque nucleofílico ao próton ligado a hidroxila da serina, desta forma inibido a reação de hidrólise. Por outro lado, a parti do pH 6.0 a um aumento na catálise enzimática, com a atividade máxima correspondendo ao pH ótimo 9.0, (Figura 12). Este fenômeno é também explicado pelos estudos mecanísticos da tríade catalítica, uma vez que a partir do pH 6.0, o resíduo de histidina começar a passar pela desprotonação do hidrogênio ligado ao nitrogênio interno do anel (pK_R da histidina é 6,0) (BODE e SCHWAGER, 1975; KISHIMURA et al, 2008; KASSERR; LAIDLER, 1969).

O resultado encontrado de maior atividade já foram descritos por outros autores; Wagner e colaboradores (2000) purificaram uma enzima semelhante a tripsina em sementes de uma espécie vegetal e, encontrou atividade ótima da

enzima em pH 10. Kumari e colaboradores (2009) purificaram uma serino protease do látex da *Ficus religiosa* que apresentou ótimo pH na faixa de 8.0 – 8.5. Yadav e colaboradores (2006) isolaram uma serino protease do látex *Euphorbia milii* que apresentou atividade na máxima em pH 8.0.

Figura 12: – Avaliação do pH ótimo na atividade proteolítica do extrato das sementes *L. leucocephala*. Os ensaios enzimáticos foram realizados com o substrato BApNA em pHs variando de 4,0 a 10,0.



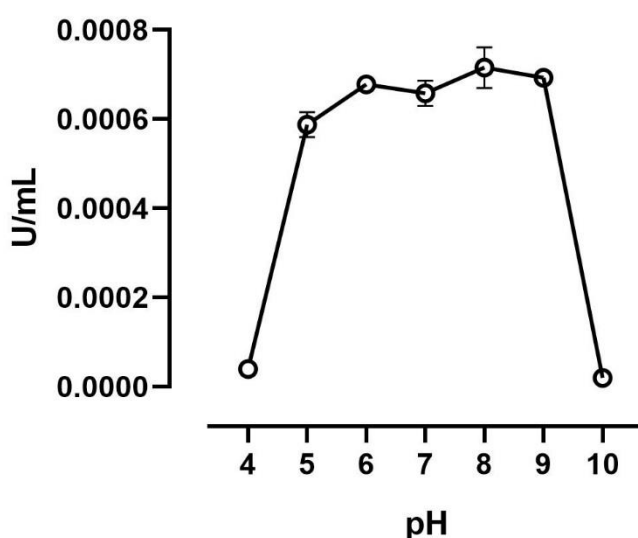
Fonte: Fonte: elaborada pelo autor, 2023

Resultado semelhante foi relatado por Siritapetawee e colaboradores (2012) que isolaram uma serino protease do látex *Artocarpus heterophyllus* e também exibiu atividade ótima no pH 8.0. O grupo de pesquisa de Sharma (2012) purificaram uma serino protease da *Ficus religiosa* e exibiu atividade ótima na faixa de pH 6.0 – 8.0.

A estabilidade da enzima em diferentes pH define sua utilidade em diversos setores industriais, principalmente na produção de detergentes devido a alcalinidade desses produtos (LADEIRA et al 2012; SHAMAR et al, 2019; YANG, et al 2024). A serino protease das sementes da *L. leucocephala* é estável numa ampla faixa de pH, pois manteve elevada atividade enzimática entre o pH 5.0 a 9.0, como mostra a figura 13. Semelhantes a este resultado,

Sharma e colaboradores (2012) purificaram uma serino protease que se manteve estável numa ampla faixa de pH 4.0 – 11. Assim também, Ahmed e colaboradores (2009) purificaram uma serino protease das sementes da *Solanum dubim* que demonstrou estabilidade a uma extensa faixa de pH 3.0 – 12. E por fim, Yadav e colaboradores (2006) isolaram uma serino protease que manteve alta atividade enzimática numa ampla faixa de pH 5,5 – 12.

Figura 13: – Avaliação da estabilidade na atividade em proteolítica da serino protease presente no extrato das sementes *L. leucocephala* em diferentes pH. Os ensaios enzimáticos foram realizados com o substrato BApNA em pHs variando de 4,0 a 10,0.



6.1.6 Ensaio de temperatura ótima e estabilidade térmica

O pH e a temperatura são dois parâmetros importantes para um bom funcionamento de uma enzima, a regulação desses fatores em teste enzimáticos é de fundamental relevância para a enzima atingir o máximo de sua atividade catalítica (FRANÇA, 2013). Encontrar a temperatura ótima desta enzima é um passo importante para prováveis aplicações biotecnológicas.

Na figura 14 é possível observar o comportamento da serino protease da *L. leucocephala* em diferentes temperaturas. A temperatura de 40°C foi onde a

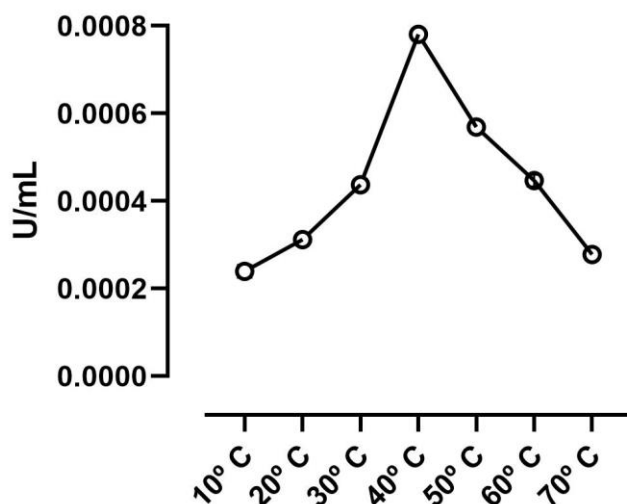
enzima apresentou a sua atividade máxima, só que acima da temperatura ótima a atividade enzimática começou a decair. Os resultados obtidos no ensaio de temperatura ótima estão adequados com os dados descritos na literatura. Já foi observado atividade de serino proteases de plantas elevada no intervalo de temperatura que variava de 20C° a 50C° (ANTÃO e MALCATA, 2005)

Toda enzima possui uma temperatura ótima de funcionamento, onde sua atividade é máxima, e a velocidade catalítica acelera com o aumento da temperatura. Porém, quando a temperatura aumenta acima das condições ótimas, a velocidade da reação diminui consideravelmente. Isso ocorre devido a desnaturação enzimática, que resulta da perda estrutura nativa da enzima. A desnaturação ocorre pela quebra das ligações de hidrogênio e de outras ligações não covalentes e modifica o arranjo dos aminoácidos no sítio ativo, alterando sua forma e causando perda da atividade catalítica da enzima (SUBISSAY, 2022).

Ao correlacionar os nossos resultados com outras proteases descritas na literatura, observamos uma ampla faixa, quanta a temperatura ótima, o que pode está relacionada a presença de ligações dissulfetos na estrutura molecular, ou a presença de carboidratos ligados a cadeia peptídica. Ahmed e colaboradores (2009) purificaram uma serino protease das sementes da *Solanum dubim* com temperatura ótima de 70° C; Tomar e colaboradores isolaram uma serino protease presente no látex da planta *Wrightia tinctoria* (Roxb) R. Br. que apresentou temperatura ótima a 80° C; Santos (2020) relatou em seus estudos, a atividade ótima para uma serino protease purificada das sementes da *Crotalaria stipularia* a 50° C.

Proteases que apresentam atividade catalítica máxima em altas temperaturas possibilitam aplicações indústrias que exigem elevadas condições térmicas. Além da atividade ótima em temperaturas elevadas, a estabilidade térmica por um período de tempo em altas temperaturas é um outro parâmetro importante em bioprocessos e confere a prótease um alto valor biotecnológico (JELLOULI et al, 2009). Logo, uma protease que mantém suas atividades em temperaturas elevadas pode ser empregadas em processos indústrias sem grande risco de perda de atividade (PRAKASH e JAISWAL, 2009).

Figura 14: – Avaliação da temperatura ótima na atividade em proteolítica do extrato das sementes *L. leucocephala* diante da hidrólise do BApNA



Fonte: elaborada pelo autor, 2023

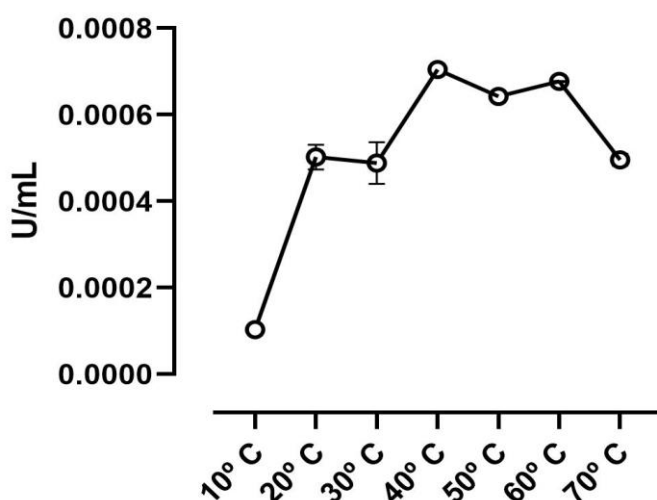
Nessa perspectiva a estabilidade térmica é uma característica relevante em determinadas classes enzimáticas. A serino protease das sementes da *L. leucocephala* apresentou estabilidade térmica alta nas temperatura de 40° C, 50° C e 60° C com retenção de 0,0007045 U/mL, 0,0006425 U/mL, 0,0006770 U/mL de atividade enzimática, respectivamente (Figura 15).

Gomes e colaboradores (2007) relataram que alguns componentes estruturais presente nas proteínas contribui para aumentar a termoestabilidade, como a presença de empacotamento hidrofóbico, propensão a estruturas secundárias, estabilização de dipolo em hélice, ausência de resíduos de aminoácidos sensíveis à oxidação ou desaminação e presença de interações eletrostáticas. Diversas serino protease de plantas termoestáveis já foram descritas na literatura.

Pande e colaboradores (2006) purificaram um serino protease proveniente do látex da *Cryptolepis buchanani* que apresentou estabilidade térmica elevada (80°C), KUMARI e colaboradores isolaram uma serino protease presente no látex no *Ficus religiosa* que retém mais de 80% da sua atividade residual na faixa de temperatura de 20°C – 65°C, Ahmed e colaboradores purificaram um serino protease das sementes da *Solanum dubim* que demonstrou

estabilidade térmica a 60°C, resultado semelhante foi relatado por Li e colaboradores (2018) que purificou uma serino protease do fruto *Cyphomandra beteca* Cav. que se manteve estável na temperatura de 60°C.

Figura 15 – avaliação da estabilidade térmica na atividade proteolítica no extrato das sementes *L. leucocephala* diante na hidrólise do BApNA



Fonte: Fonte: elaborada pelo autor, 2023

6.1.7 Efeito dos íons metálicos

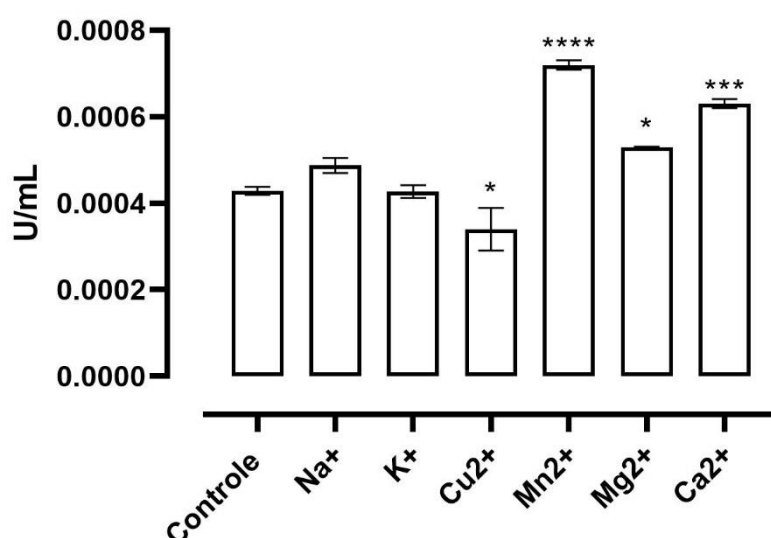
Algumas enzimas exibem cofator, isto é, para exercerem a sua atividade catalítica necessitam está ligada a um íon metálico. Para verificar se a protease presente nas sementes da *L. leucocephala* tem a sua atividade modificada na presença de íons metálicos, estes foram introduzidos a reação e incubadas em temperatura e pH ótimo da enzima por uma hora.

Os efeitos dos íons metálicos na atividade enzimática pode ser observado na figura 16. As amostras expostas aos Na^+ , K^+ e Cu^{2+} não apresentaram diferenças significativas de atividade em comparação ao grupo controle. No entanto, os íons Mn^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} apresentaram diferença significativa.

A atividade da serino protease foi levemente inibida pela presença dos íons Cu^{2+} , esse efeito pode ter ocorrido possivelmente pela capacidade dos íons metálicos ligar –se aos resíduos catalíticos no sítio ativo da enzima (MUTHU et

al, 2017). Muthu e colaboradores (2017) relataram resultado semelhante de uma serino protease purificada da *Wrightia tinctoria* que foi ligeiramente inibida (33%) pela ação de 10mM de íons Cu^{2+} . Já os íons cátions monovalentes Na^+ e K^+ não apresentaram nenhum efeito inibitório sobre a atividade enzimática da serino protease da *L. leucocephala*, resultado semelhante foi descrito por Shamar e colaboradores (2012) de uma serino protease purificada do *Ficus religiosa*. Além disso, os íons Mn^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} melhorou a atividade da enzima de forma significativa, Kumar e Takagi (1999) descreveram que algumas proteases requerem a presença de íons metálicos divalentes, assim como os íons metálicos usados no experimento.

Figura 16 – Análise dos efeitos dos íons metálicos na atividade enzimática da serino protease presente no extrato das sementes da *L. leucocephala*. As barras verticais representam a média do erro padrão em três determinações diferentes (*= $p<0,02$; ***= $p<0,0002$; ****= $p<0,0001$).



Fonte: elaborada pelo autor, 2023.

Cui e colaboradores (2015), demonstraram acréscimo da atividade de serina protease alcalina presente uma bactéria marinha, quando adicionado íons metálicos de Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , na concentração de 5mM. Assim, a serino protease das sementes da *L. leucocephala* apresentou uma boa estabilidade catalítica frente a maioria dos íons testados, o que a torna adequada para uso em diferentes seguimentos industriais, especificamente em processamento de

alimentos, produção de bebidas, clarificação e muitas outras aplicações (MUTHU et al, 2017).

6.1.8 Efeito dos solventes orgânicos na atividade proteolítica da serino-protease presente no extrato das sementes da *L. leucocephala*.

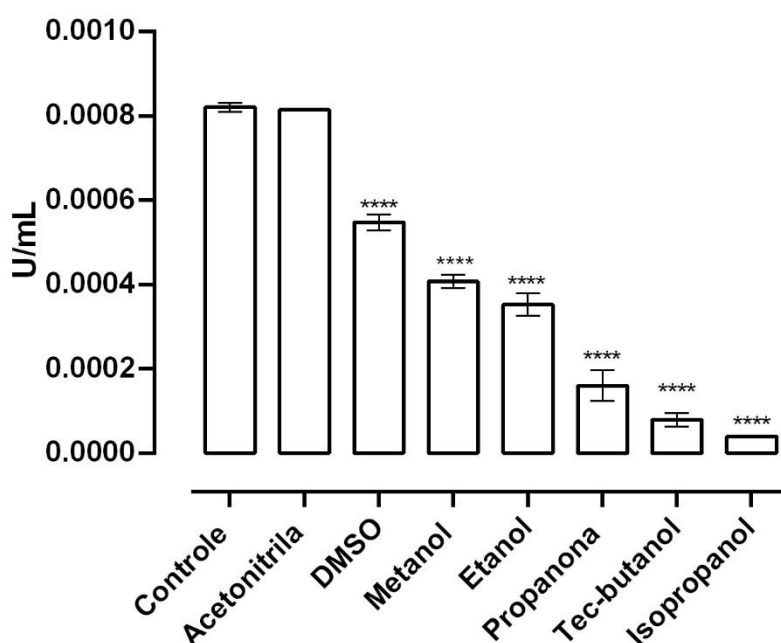
As proteases apresentam diversos níveis de resistência a solventes orgânicos e, normalmente, as enzimas tem suas atividades catalíticas diminuídas na presença de solventes orgânicos. Geralmente, a presença de solvente orgânico diminui a flexibilidade estrutural da enzima que é importante para o processo de catálise (DOUKYU e OGINO, 2010). Além disso, nas serino proteases o efeito dos solventes orgânicos tem sido relacionado a um aumento na hidrofobicidade do meio, o que pode levar à quebra das ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas no sítio ativo, levando a modificação na conformação nativa da proteína podendo levar a efeitos negativos ou positivos na atividade enzimática (BARBERIS et al, 2006). Consequentemente, o efeito dos solventes orgânicos na atividade enzimática ocorre de maneira diferente de proteases para protease.

A enzima testada manteve de forma significativa atividade enzimática moderadamente alta em relação ao controle para a maioria dos solventes orgânicos testados, após 1h de pré – incubação. A estabilidade do solvente orgânico foi observada na seguinte ordem: acetonitrila (0,0008201 U/mL) > DMSO (0,0005473 U/mL) > metanol (0,0004072 U/mL) > etanol (0,0003522 U/mL) > propanona (0,0001600 U/mL) > tec – butanol (0,00007955 U/mL) > isopropanol (0,00003965 U/mL), respectivamente. Figura 17. Estes resultados demonstraram que a protease presente nas sementes da *L. leucocephala* é altamente estável na presença de acetonitrila e DMSO, assim como é parcialmente estável na presença metanol e etanol, o que é essencial em proteases aplicada em processos industriais. A aplicação mais relevante de uma protease resistente a solventes orgânicos é a síntese de peptídeos e ésteres, que são produzidos em ambientes não-aquosos pelas indústrias (TAREK et al, 2023).

Mathu e colaboradores (2017) relataram que a serino protease purificada da *Wrightia tinctoria* apresentou a seguinte ordem de estabilidade: propanona

(83%) > etanol (63%) > 2 – propanol (59%) > metanol (37%) > DMSO (35%). Diferente da observada na serino protease nas sementes da *L. leucocephala*. Sharma e colaboradores (2011) relataram que a serino protease isolada da *Ficus religiosa* reteve 100% da sua atividade enzimática quando colocada contra o metanol e manteve a atividade catalítica acima de 60% quando reagiu com etanol e acetonitrila.

Figura 17 – Efeito dos solventes orgânicos na atividade proteolítica da serino protease presente nas sementes da *L. leucocephala*. As barras verticais representam a média do erro padrão em três determinações diferentes (****=p<0,0001).



Fonte: elaborada pelo autor, 2023.

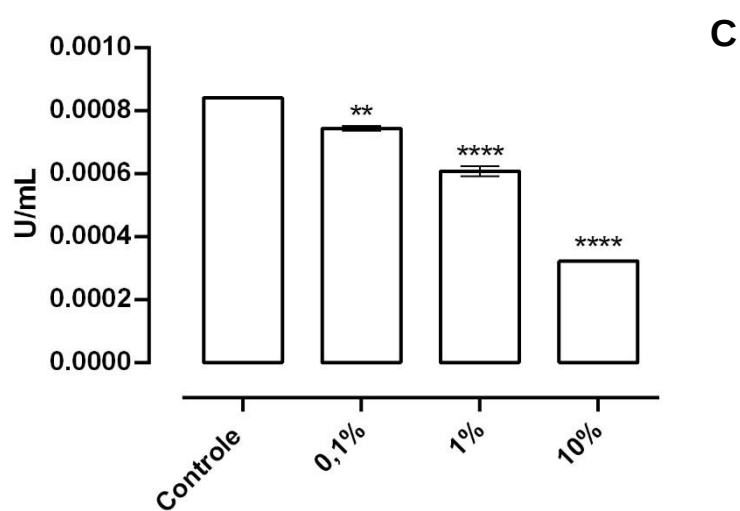
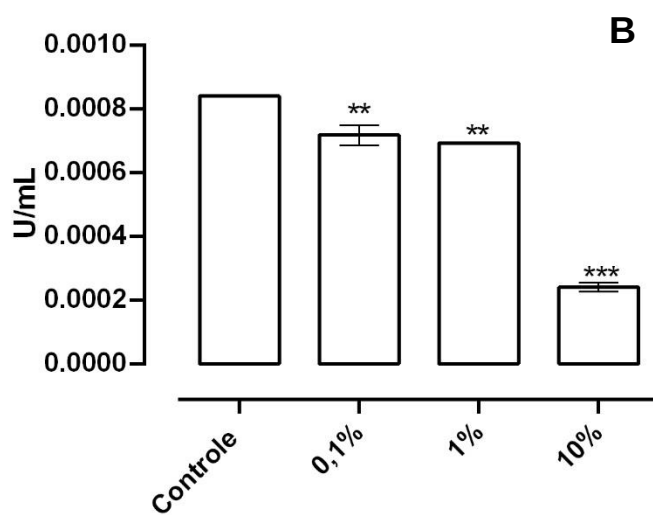
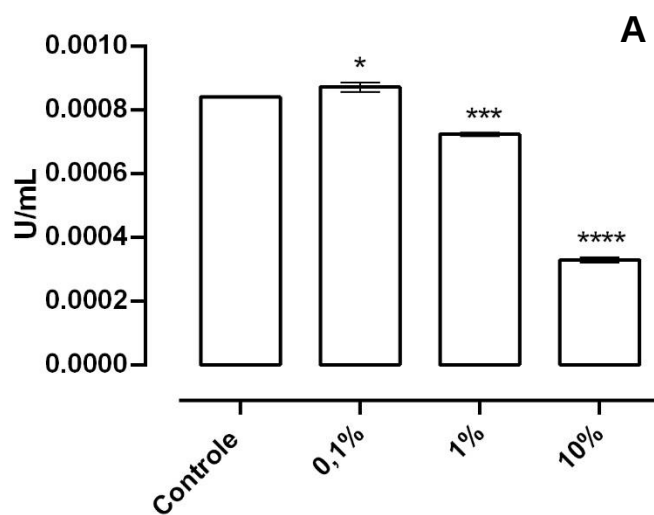
6.1.9 Efeito de agentes surfactantes na atividade proteolítica da serino protease presente no extrato das sementes da *L. leucocephala*.

A estabilidade da atividade proteolítica da serino protease presente nas sementes *L. leucocephala* frente a diferentes agentes surfactantes é uma característica importante para futura aplicação desta enzima na indústria de

detergentes. Portanto, foi testada a estabilidade da enzima frente aos detergentes Triton x 100, Tween 40 e Tween 80, onde foi observado uma leve perda da atividade enzimática de forma significativa em quase todas as concentrações testadas. O Triton x 100 é um surfactante não iônico muito usado nas preparações de detergentes (PRAZERES et al, 2006) e, na presença de 0,1% deste agente não ocorreu alteração na atividade enzimática. Já na concentrações de 1% ela manteve expressivamente a atividade enzimática, mas foi fortemente inibida quando a enzima reagiu com o Triton x 100 a 10%, figura 18 (A).

Silva – Lopes e colaboradores (2016) relataram resultado semelhante ao analisarem serino proteases presente no extrato de folhas e sementes da *Macuna pruriens*. Além disso, a enzima apresentou uma pequena perda de atividade enzimática na presença de Tween 40 e Tween 80, nas concentrações de 0,1% (p/v) e 1%(p/v) com atividade enzimática elevada para ambos os agentes surfactantes. Mas atividade enzimática foi bastante reduzida quando na presença de 10% de Tween 40 e Tween 80, figura 18 (B) e (C). Das e colaboradores (2018) relataram uma serino protease presente na *Benincasa hispida* que demonstrou estabilidade elevada ao Tween 80 (atividade enzimática residual acima de 81%) e moderadamente estável ao Triton x 100 (atividade residual acima de 46%). Já Moreno-Hernández e colaboradores (2017) ao analisarem uma serino proteases do fruto da *Bromelia piquin* frente ao Tween 80 (1% p/v) causou perda de 35% da atividade enzimática, enquanto as concentrações de 2% e 5% (p/v) causaram perda da atividade cerca de 53% e 75%, respectivamente, semelhante ao dados encontrados para a serino protease presente nas sementes da *L. leucocephala*.

Figura 18 – Efeito dos agentes surfactantes na atividade proteolítica da serino protease presente nas sementes da *L. leucocephala*. Figura (A) efeito do triton x 100, figura (B) efeito do Tween 40 e figura (C) efeito do Tween 80. As barras verticais representam a média do erro padrão em três determinações diferentes (*= $p < 0,049$; **= $p < 0,0011$; ***= $p < 0,0004$; ****= $p < 0,0001$).



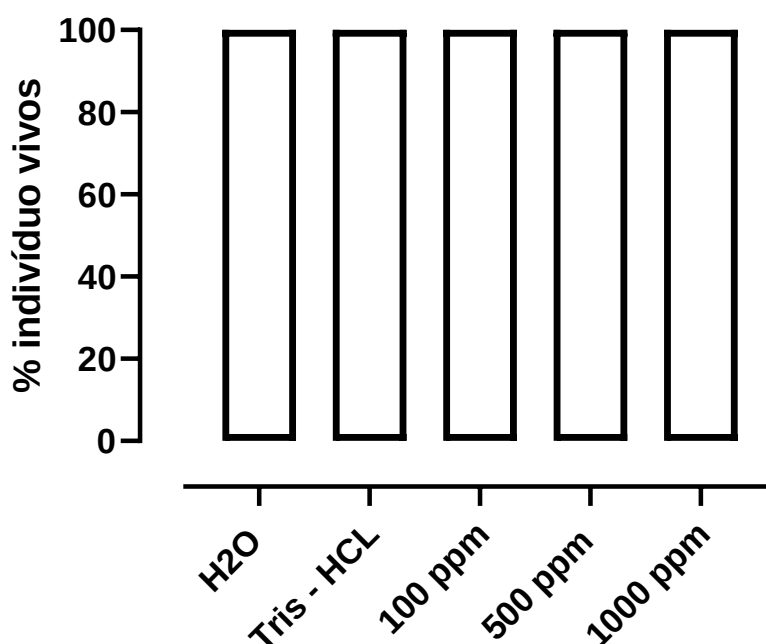
Fonte: elaborada pelo autor, 2023.

6.1.10 Avaliação de toxicidade através de bioindicador

Artemia salina é um microcrustáceo da ordem Anostraca que vive em água salgada e serve de alimentos para peixes. O ensaio de toxicidade frente aos náplios de *A. Salina* é utilizado como método alternativo para a determinação de toxicidade, pois demonstra a sensibilidade da *A. Salina* a substâncias tóxicas. Assim, a letalidade a este microcrustáceo pode ser usada como ensaios rápidos e simples durante o isolamento de produtos naturais. O ensaio de toxicidade frente ao microcrustáceo *A. salina* foi realizado com extrato da *L. leucocephala* em diferentes concentrações. Os resultados obtidos após 24h, são mostrados conforme a figura 19.

Na análise comportamental da *A. salina* em contato com as concentrações demonstrou que não ocorreu alteração referente à mortalidade das larvas em relação ao controle, demonstrando a ausência de influência sobre a movimentação do organismo estudado. Assim, após 24 horas de exposição da *A. salina* não foi observado morte em nenhuma das concentrações administradas.

Figura 19 – Efeito da toxicidade do extrato *L. leucocephala* frente ao microcrustáceo *A. salina*.



Fonte: elaborada pelo autor, 2023.

Meyer e colaboradores (1985) definiram uma correlação entre grau de toxicidade e a concentração letal média (CL50) apresentada a extrato de plantas frente a larvas de *A. salina*, levando em conta a molécula como tóxica (CL50 até 500 ppm), moderadamente tóxica (CL50 de 500 ppm a 1000 ppm) e atóxica ou de baixa toxicidade (CL50 acima de 1000 ppm). Portanto, o extrato testado das sementes da *L. leucocephala* pode ser considerado atóxico ou de baixa toxicidade por este método.

Resultados semelhante foi relatado por Barros (2022) ao realizar ensaios de toxicidade de extrato aquoso de bambu (*Guadua angustifolia*) frente a *A. salina*, onde foi observado ausência de mortes nas larvas nas deferentes concentrações testadas. Do mesmo modo, foi descrito por Silva (2012) ao realizar teste de toxicidade frente a *A. salina* com extrato de *Caesalpinia echinata*.

6.2 Aplicação Biotecnológica para o extrato bruto da espécie *L. leucocephala*

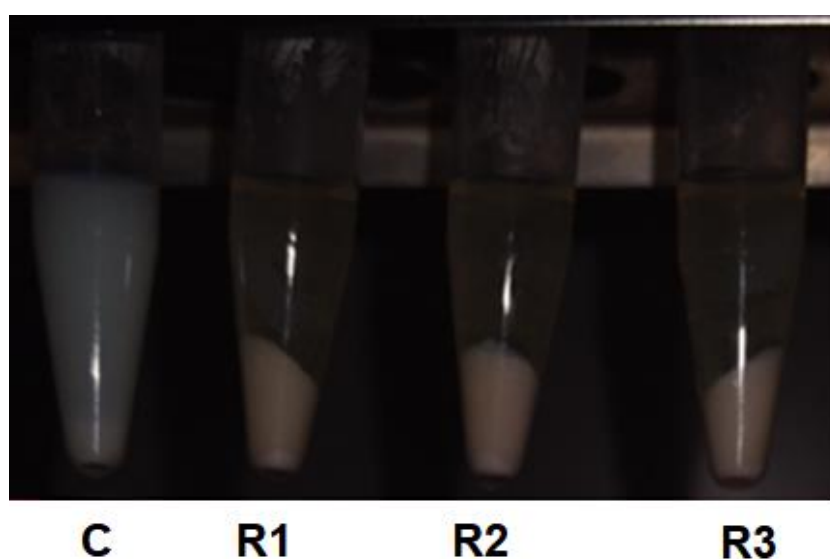
6.2.1 Teste de coagulação do leite desnatado

Os resultados mostrados pelo experimento demonstra que o extrato enzimático das sementes secas de *L. leucocephala* possuem ação positiva para a finalidade prevista, principalmente, coagular proteínas do leite bovino em pó desnatado, correspondendo a atividade específica (unidade de coagulação por miligrama de extrato enzimático) estimada em 13,3 mU/mL de enzima (Figura 20).

Aplicações biotecnológicas semelhantes foram descritos em outros trabalhos, Abebe e Emire (2020) relataram atividade coagulante de leite a partir do extrato de *African calotropis*. Nicosia e colaboradores (2022) demonstrou atividade coagulante em preparações de leite semidesnatado, usando extrato enzimático do fruto do kiwi. Fguiri e colaboradores (2021) comparou as propriedades coagulantes de leite do extrato enzimático do fruto kiwi, abacaxi e gengibre.

Os testes efetuados em triplicas demonstraram que o preparado de leite bovino em pó desnatado é passível de atividade proteolítica da caseína, por ação de serino proteases, já a amostra “C”, que configura o controle da reação, não houve atividade formadora de coágulo de leite, como pode ser observado na figura 20. Portanto, demonstrou-se que o método de preparo do extrato enzimático usando o tampão Tris-HCl é altamente compatível com a aplicação defendida no experimento, já que não interferiu nos atributos físico-químicos do leite e, que toda ação coagulante ocorreu diretamente pela interação das proteases presentes no extrato enzimático das sementes de *L. leucocephala*.

Figura 20 – Ação coagulante do Extrato das sementes *L. leucocephala*: “R1”, “R2” e “R3” representa análises em triplicatas da coagulação do leite em pó desnatado reconstituído. C representa o controle negativo da reação, em que fora adicionado o tampão tris – HCl, 50 mM, pH 8,0 ao leite em pó desnatado reconstituído.

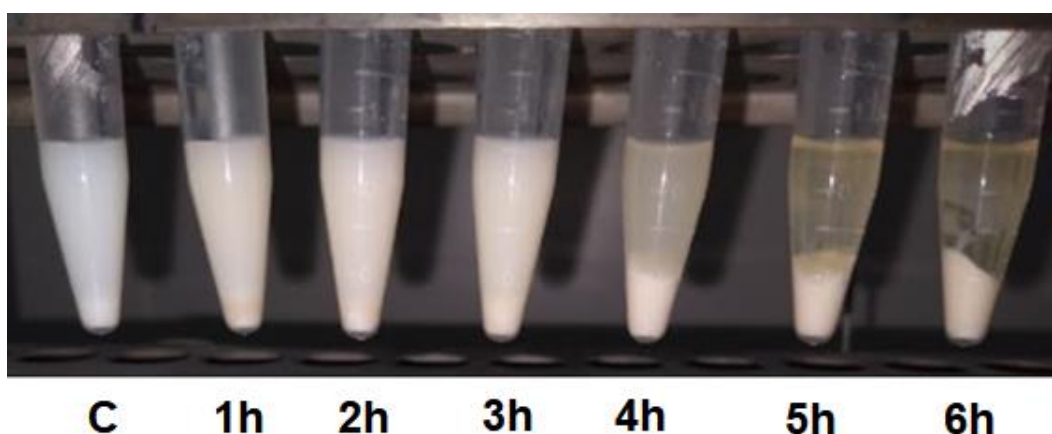


Fonte: elaborada pelo autor, 2023

Após confirmação da eficiência do método e, quantificação da concentração mais baixa de extrato bruto (0,155mg/mL) necessária para atingir a total coagulação do leite compreendida em 0,5mL de solução, foi realizada ensaios de curva de tempo, conforme observado na figura 21.

Em relação a análise, podemos observar que em um período 4h de reação, foi capaz visualizar a formação do coagulo volumoso e, em 5h de experimento, a caseína foi hidrolisada totalmente. Verificamos que no período subsequente de incubação (6h) a massa do coagulo não aumentou de maneira expressiva.

Figura 21 – Curva de tempo da ação coagulante do extrato das sementes de *L. leucocephala*, a reação ocorreu a 37°C. “1h”, “2h”, “3h”, “4h”, “5h” e “6h” representa análises em diferentes tempo da ação coagulante do leite desnatado reconstituído. A amostra C representa o controle negativo da reação, em que fora adicionado o tampão tris – HCl, 50 mM, pH 8,0 ao leite em pó desnatado reconstituído.



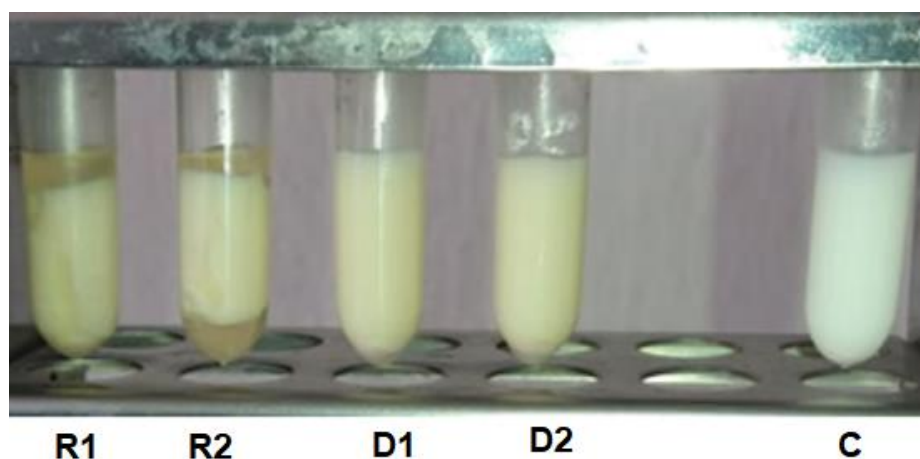
Fonte: elaborada pelo autor, 2023.

6.2.2 Estabilidade térmica

No ensaio de estabilidade térmica, foram preparadas duas duplicatas referentes à máxima atividade coagulante, em que as mesmas foram sujeitas a mesma temperatura e tempo de incubação. O extrato referente a duplicata “D1 e D2” foi previamente fervido antes do ensaio. Na figura 22 é possível observar que o extrato fervido inativou a atividade coagulante de leite, comprovando que a atividade proveniente do extrato encerra quando é submetido a temperaturas elevadas, demonstrando que o agente coagulante possui estrutura proteica, comprovando mais uma vez que a atividade coagulante é de natureza

enzimática, considerando que esta é uma característica comum em diversas classes de enzimas que podem ser inativadas quando expostas a alta temperaturas (SUBISSAY, 2022).

Figura 22 – Teste de estabilidade térmica na ação coagulante do Extrato das sementes *L. leucocephala*: “R1 e R2” representa o controle positivo em duplicatas da coagulação do leite em pó desnatado reconstituído. A mostra “D1 e D2” representa as amostra desnaturadas (aquecidas a 100° C) em duplicatas. E a amostra C representa o controle negativo da reação, em que foram adicionado o tampão tris – HCl, 50 mM, pH 8,0 ao leite em pó desnatado reconstituído.

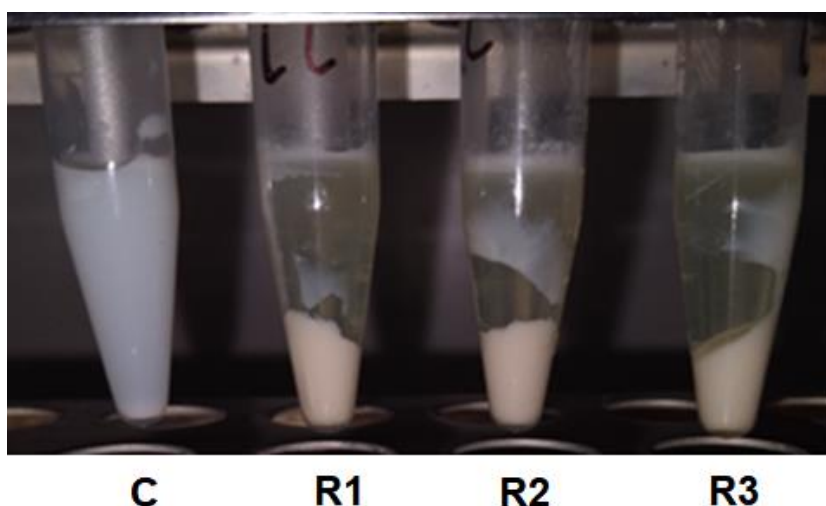


6.2.3 Teste de coagulação de leite integral pasteurizado na ação coagulante

Uma vez demonstrado a eficiência da serino protease na coagulação do leite desnatado, realizamos teste correspondente com leite integral pasteurizado, figura 23. Assim, por meio do ensaio executado, podemos observar que extrato enzimático foi muito eficaz em processar o substrato. Além disso, a enzima demonstrou uma atividade catalítica específica (83,33 mU/mL) mais expressiva no leite integral pasteurizado, do que no leite bovino em pó desnatado reconstituído, que apresentou atividade específica de 13,3 mU/mL, quando submetido as mesma condições de ensaio experimental, evidenciando a aplicabilidade da serino protease do nosso estudo, no processamento de leite *in natura*.

Comportamento semelhante foi relatado por Santos (2020) que demonstrou que uma serino protease presente no extrato da *Crotalaria stipularia* que apresentou atividade catalítica específica maior quando submetida a coagulação do leite integral pausterizado, quando comparado ao processamento do leite em pó desnatado.

Figura 23 – Ação coagulante do extrato das sementes de *L. leucocephala*: as análises foram realizadas em triplicatas e, a reação ocorreu a 37°C. “R1”, “R2” e “R3” representa análises em triplicatas da coagulação do leite integral pasteurizado. A amostra C representa o controle negativo da reação, em que fora adicionado o tampão tris – HCl, 50 mM, pH 8,0 ao leite integral pasteurizado.

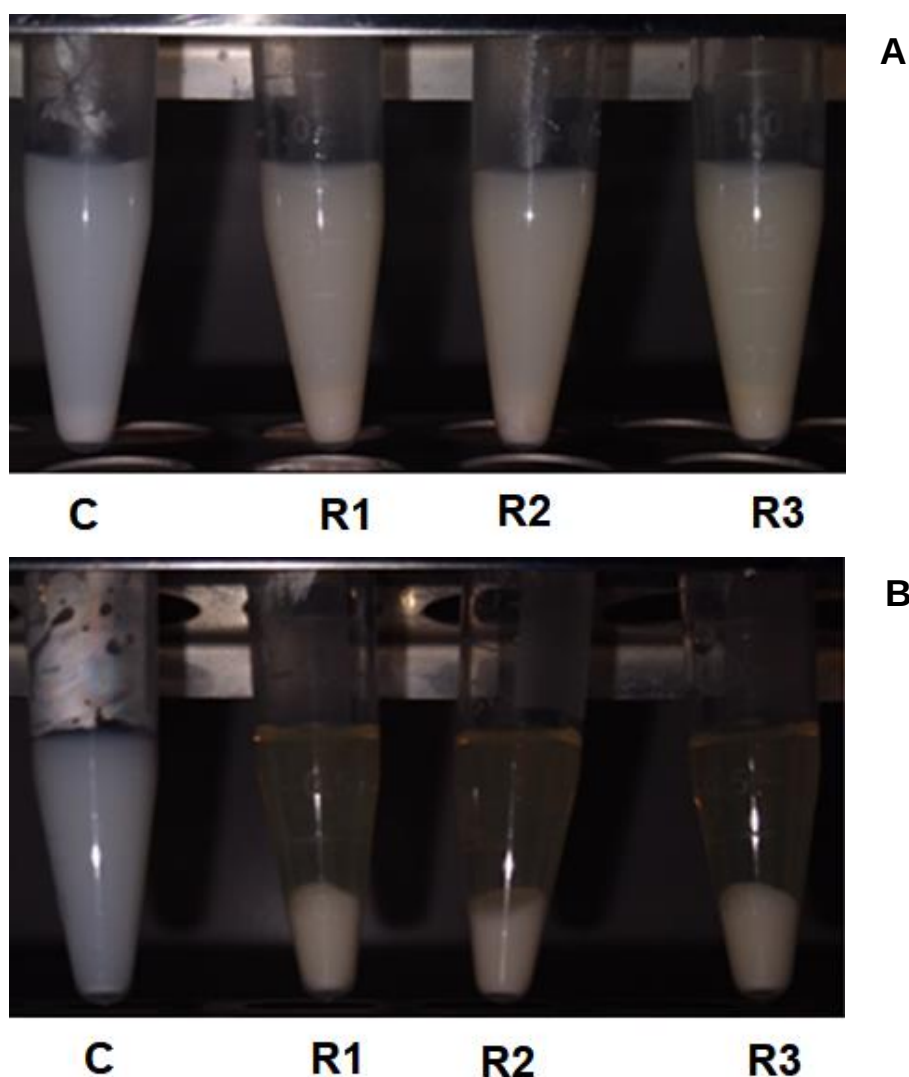


Fonte: elaborada pelo autor, 2023.

6.2.4 Efeito da temperatura no processo de coagulação do leite

Uma das características das enzimas biológicas é exibirem mecanismos de hidrólises distintos, à medida que a temperatura reacional é modificada. E se tratando das serinas proteases, observamos que essas enzimas apresentam estabilidades quando submetidas a condições de temperaturas moderadamente altas (SANTAN et al, 2013; KUMARI et al, 2010; SHARMA et al, 2012; GOMES et al, 2007). Devido a isso, foi analisado a atividade coagulante do leite do extrato enzimático frente a temperatura de 37°C e 50°C (Figura 24).

Figura 24 – Efeito da temperatura ótima da ação coagulante do extrato enzimático das sementes da *L. leucocaphala*: (A) representa a reação coagulante do leite encubada a 37°C, (B) representa a coagulante do leite encubada a 50°C. As amostras R1", "R2" e "R3" representa análises em triplicatas da coagulação do leite em pó desnatado reconstituído. A amostra C representa o controle negativo da reação, em que fora adicionado o tampão tris – HCl, 50 mM, pH 8,0 ao leite em pó desnatado reconstituído.



Fonte: elaborada pelo autor, 2023.

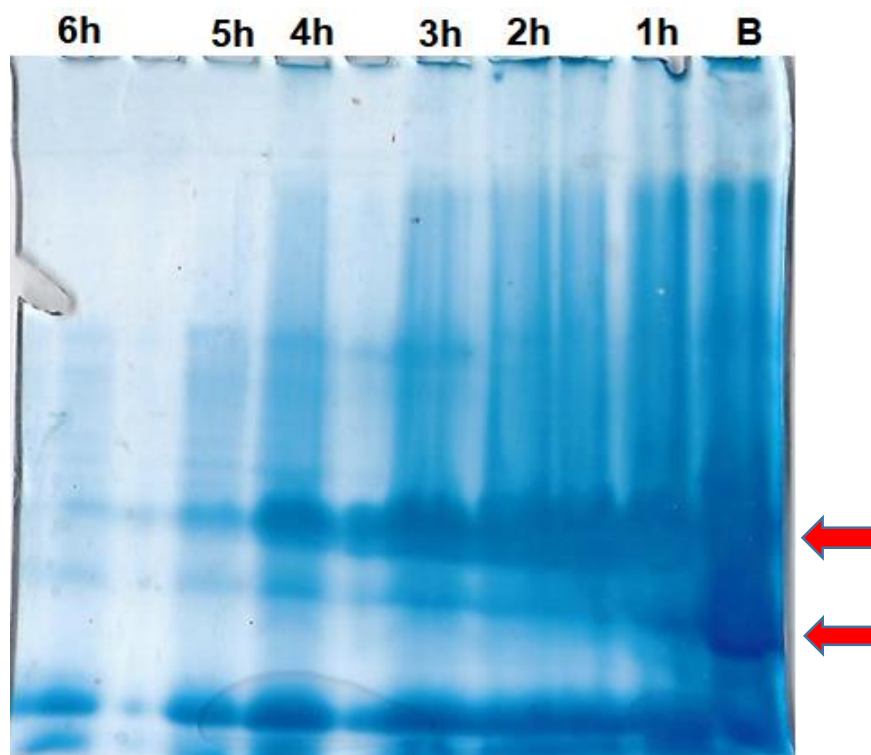
Como demonstrado na figura 24 II, a atividade enzimática do material ocorreu de forma mais evidente na temperatura de 50°C (22,2mU/mL), diminuindo o tempo de total de coagulação do leite, que ocorreu em 3 horas,

quando comparado a reação a 37°C, figura 24 I. Comportamento semelhante foi relatado por Sharma e colaboradores (2012) que demonstraram atividade ótima (50°C) de uma serino protease isolada do *Ficus religiosa*, por intermédio de estudos de coagulação. Do mesmo modo, Santos (2020) relatou uma serino protease presente no extrato enzimático das sementes da *Crotalaria stipularia* que apresentou atividade coagulante ótima a 50°C. Assim como, Lo Piero e colaboradores (2002) purificaram uma serino protease (tripsina – símile) das folhas do alface (*Lactuca sativa* L. cv Romana) que demonstrou atividade ótima a 50°C. Rajagopalan e Sukumaran (2018) purificaram uma serino protease coagulante de leite da *Wrightia tinctoria* R. Br. que exibiu atividade ótima a 50°C.

6.2.5 Verificação da hidrólise da caseína por eletroforese e dosagem de proteínas solúveis residuais.

A potencialidade do novo coagulante de leite proveniente das sementes da *L. leucocephala* também foi analisada em razão do perfil de proteínas expresso em gel de poliacrilamida, por intermédio de eletroforese em SDS –PAGE (Figura 25). De acordo com o resultado, podemos observar que a preparação de leite bovino reconstituído possui um perfil proteico bastante diversificado (Canaleta B), sendo que os hidrolisados proteicos apresentaram uma diminuição neste teor em função do aumento do tempo de incubação, o que pode estar relacionado pela possível clivagem das proteínas decorrente da hidrólise enzimática. Resultado semelhante foi relatado por Farias e colaboradores (2020) quando analisando um potencial coagulante de leite proveniente da *Morinda citrifolia* L.

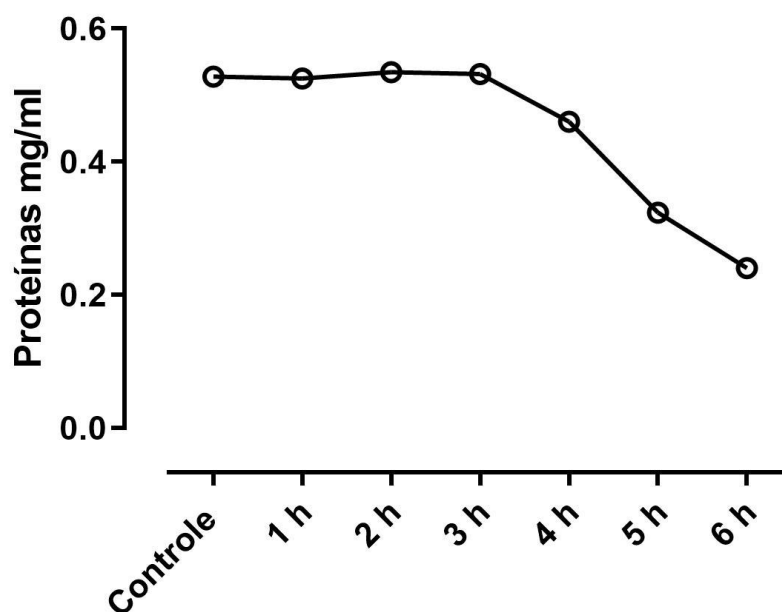
Figura 25 – Verificação da atividade coagulante por meio de eletroforese em SDS – PAGE: (B) mostra o perfil de proteínas do leite reconstituído no início da reação; nas canaletas 1h, 2h, 3h, 4h, 5h e 6h, refere-se ao perfil de proteínas do soro após os respectivos tempos de incubamento a 37°C. As setas em destaque demonstram a hidrólise das proteínas do leite em função do tempo.



Fonte: elaborada pelo autor, 2023.

Durante a hidrólise, algumas proteases além de desorganizar as micelas de caseína, podem clivar através da cadeia polipeptídica, possibilitando um aumento no conteúdo de aminoácidos e peptídeos livres presente no soro, a medida que a reação de coagulação ocorre, indicando haver precipitação de proteínas do leite característico do processo de coagulação do leite. Devido a essa possibilidade, foi avaliada a atividade enzimática do extrato vegetal pela diminuição da concentração de proteínas livres solúveis no soro do leite, usando metodologia de dosagem de proteína descrita por Bradford (Figura 26).

Figura 26 – Dosagem de proteínas residuais: a análise foi obtida por meio de quantificação de proteínas com o soro de leite em diferentes intervalos de tempo, “Branco” representa o soro do leite no tempo zero de incubação, análise foi feita a 37°C.



Fonte: elaborada pelo autor, 2023.

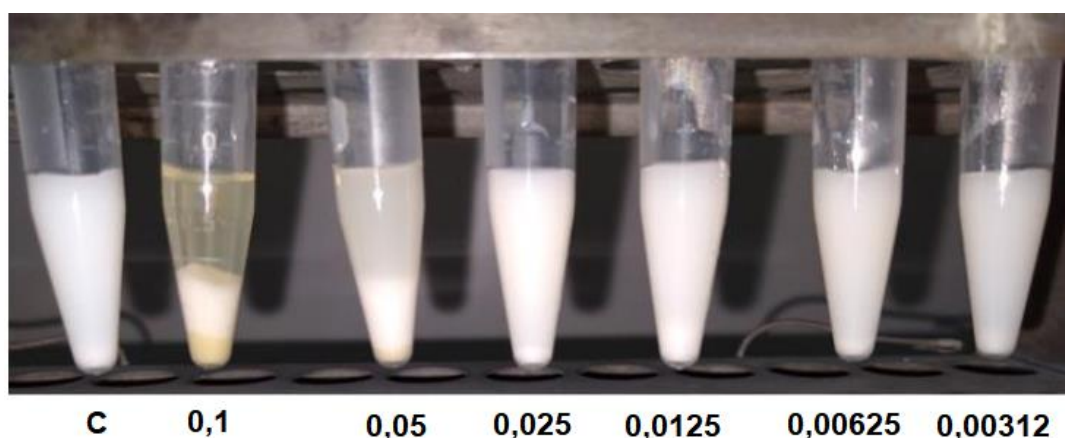
Relacionando com resultados da eletroforese em gel de policrilamida e, dosagem de proteínas residuais, observamos que ambos os experimentos corroboram para o pressuposto de que o extrato vegetal das sementes *L. leucocephala*, proporcina a hidrólise da caseínas solúveis no leite promovendo a coagulação, e que durante a hidrólise diversos aminoácidos são liberados no soro.

6.2.6 Efeito da concentração de extrato proteico da *L. leucocephala* no processo de coagulação do leite.

Diferentes concentrações de proteínas do extrato da *L. leucocephala* (0,1mg/ml, 0,050mg/ml, 0,025mg/mL, 0,0125mg/mL, 0,00625mg/mL e 0,00312mg/mL) foram testadas no processo de coagulação do leite em pó

bolvino reconstituído como pode ser observado na figura 27, ocorre uma coagulação parcial do leite na 0,05mg/mL de extrato proteico. Mas na concentração de 0,1mg/mL o leite é totalmente hidrólizado, formando um coagulo mais expressivo. No processo de coagulação do leite diversos fatores são importante para o desenvolvimento de um gel de qualidade, como temperatura, concentração de Ca^{2+} e quantidade de coagulante. A coagulação do leite é acelerada de acordo com o aumento de enzimas durante a fase enzimatica (LAW e TAMIME, 2010; MOUDR et al, 2017).

Figura 27 – Curva de proteínas (mg/mL) na ação coagulante do extrato das sementes de *L. leucocephala*: as análises foram realizadas em triplicatas e, a reação ocorreu a 50°C; no intervalo de 3 horas. A mostra C representa o controle da reação, em que fora adicionado o tampão Tris – HCl, 50 mM, pH 8,0 ao leite reconstituído.



Fonte: elaborada pelo autor, 2023.

6.2.7 Efeito da concentração de Ca^{2+} no processo de coagulação do leite.

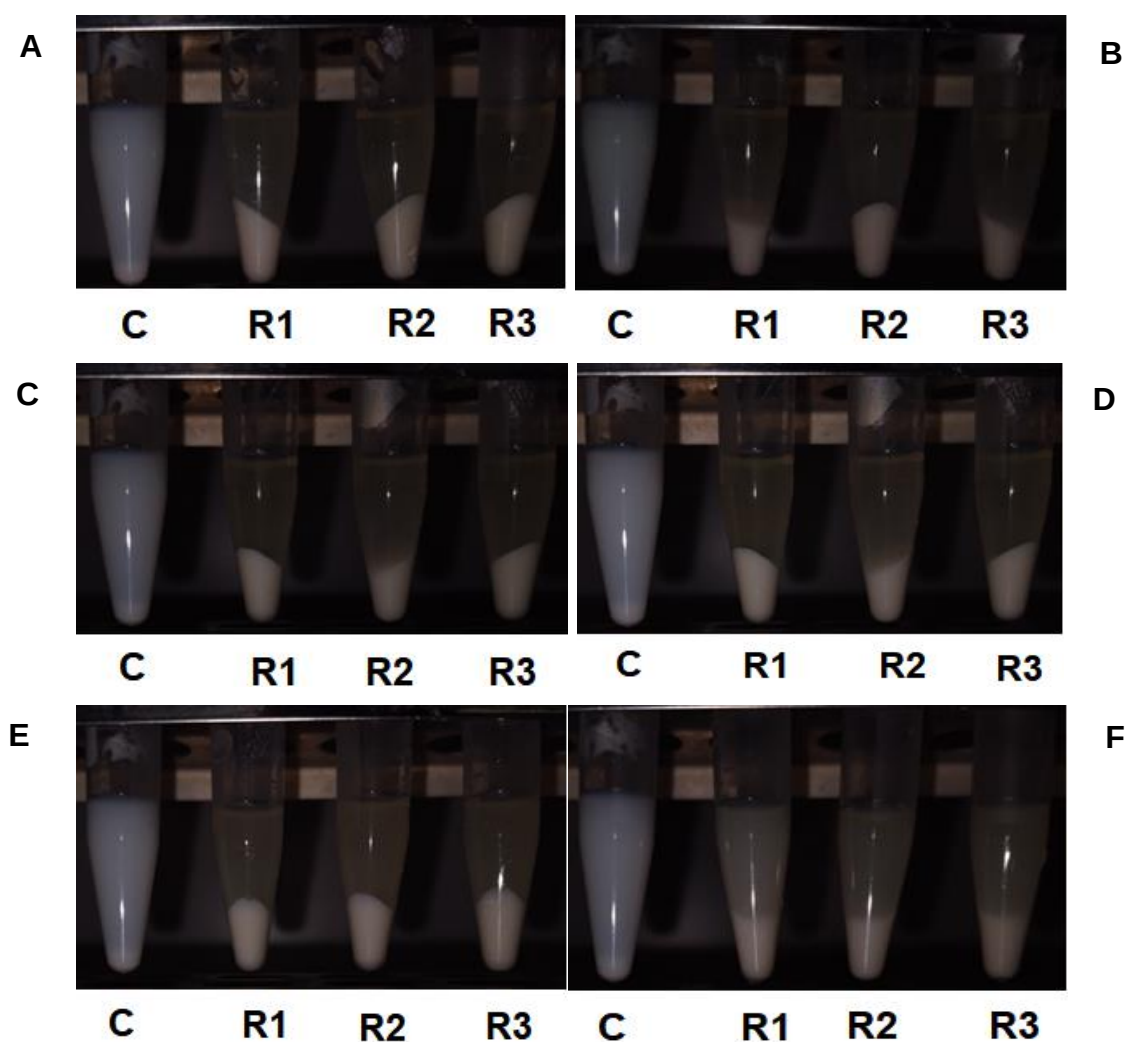
A medida que o processo de coagulação ocorre, os ions calcios são primordiais para desenvolvimento da matriz gelificada (fase não – enzimatica). Portanto, a adição de CaCl_2 é uma prática corriqueira no processo de produção de queijos, seu efeito no comportamento do gel está relacionado a diminuição das forças repulsivas entre as micelas alteradas pelo coalho, possibilitando

interações hidrofóbicas (acelerando a formação da coalhada) (HARBOE et al, 2010). Como a presença de íons Ca^{2+} é importante no processo de fabricação do queijo, avaliamos o efeito do aumento da concentração do CaCl_2 sobre o meio de reação da serino protease da *L. leucocephala*. Como pode ser observado na figura 28 e 29, a enzima coagulou leite em todas as concentrações testadas, inclusive o grupo controle (sem adição CaCl_2), a reação ocorreu na temperatura de 37°C e 50°C. Portanto, à medida que a concentração de cálcio foi sendo elevada no meio reacional, a coagulação ocorreu mais expressivamente, como pode ser demonstrado pelo soro mais límpido. Este comportamento pode ser evidenciado em ambas as temperaturas, no entanto, na temperatura de 50° C (Figura 29) a coagulação processou – se de forma completa, independente da concentração de CaCl_2 .

Portanto, a serino protease da *L. leucocephala* poderia processar as proteínas do leite na ausência de Ca^{2+} , mas o processo ocorreu de maneira mais efetiva a medida que a concentração de Ca^{2+} aumentava no meio reacional. Esse efeito dos íons Ca^{2+} na atividade enzimática corrobora com os resultados demonstrados na seção 6.2.7, onde a presença deste metal no meio reacional aumentou de forma significativa a atividade enzimática.

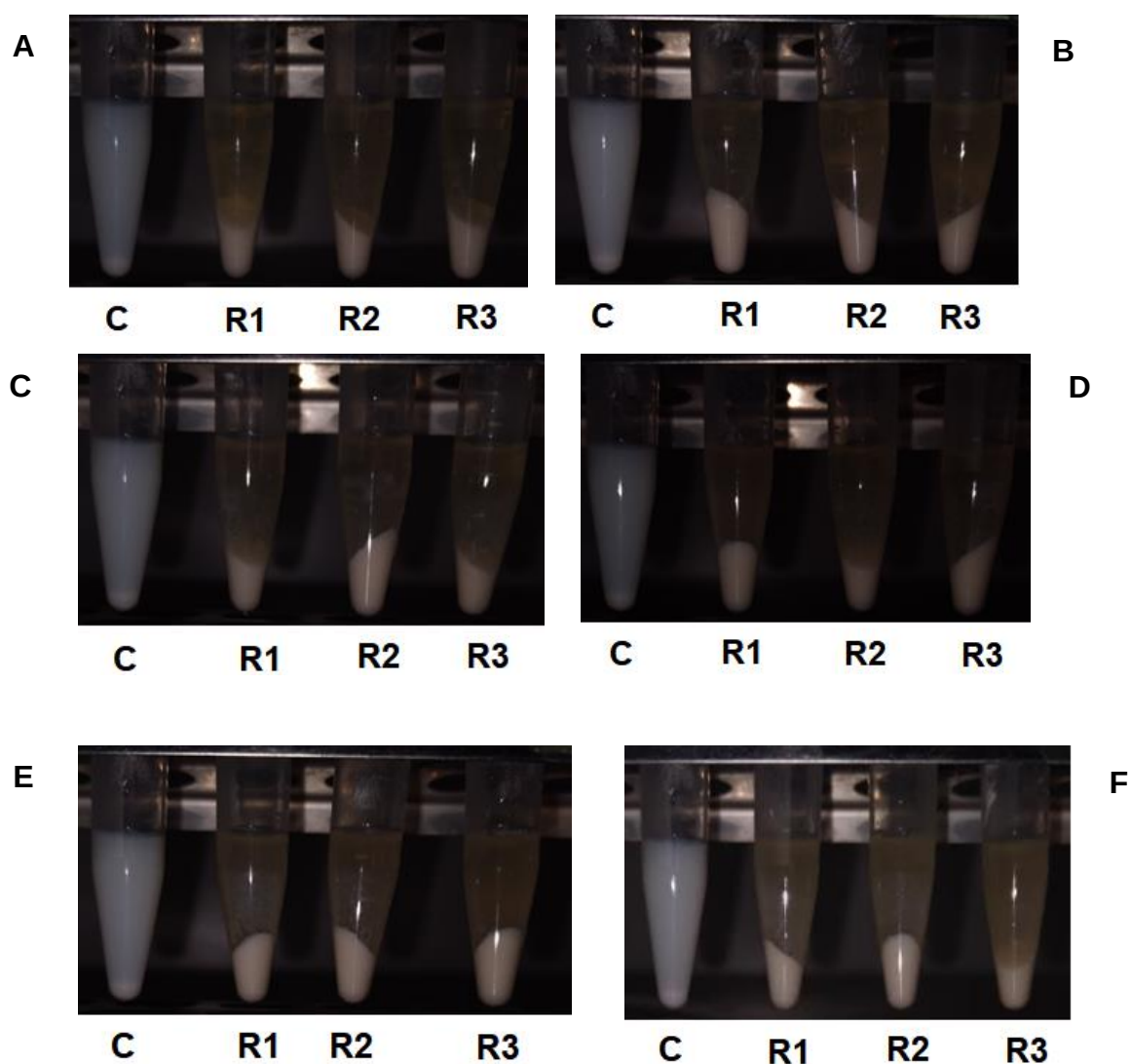
Kumari e colaboradores (2012) demonstrou que a atividade coagulante de leite de uma serino protease presente na *Ficus religiosa* aumentou em 0,2M – 0,3M de CaCl_2 . Leumi e colaboradores (2023) em estudos de concentração de Ca^{2+} demonstrou que proteases presente no extrato de *Percularia tomentosa* atingia a capacidade máxima de processamento de leite a 50mM de CaCl_2 . Resultado equivalente foi demonstrado por Arbita e colaboradores (2020) analisando efeitos do Ca^{2+} na atividade de duas proteases presente na *Gracilaria edulis*, onde a maior atividade coagulante de leite ocorreu a 50mM, mas em concentrações abaixo de 5mM não ocorreu atividade coagulante. Diferente da serino protease da *L. leucocephala* que processou o leite em concentrações de CaCl_2 abaixo de 5mM, demonstrando a alta capacidade coagulante de leite dessa enzima.

Figura 28 – Curva de concentração de CaCl_2 na ação coagulante do extrato das sementes de *L. leucocephala*: as análises foram realizadas na temperatura de 37°C. As amostras R1", "R2" e "R3" representa análises em triplicatas da coagulação do leite em pó desnatado reconstituído, a amostra C representa o controle negativo da reação, em que fora adicionado o tampão tris – HCl, 50 mM, pH 8,0 ao leite em pó desnatado reconstituído. As letras do alfabeto (A, B, C, D e E) representa as reações em que foram adicionados CaCl_2 nas concentrações de 10 mM, 8mM, 6mM, 4mM e 2mM, respectivamente. A letra "F" equivale ao controle da reação (sem CaCl_2).



Fonte: elaborada pelo autor, 2023.

Figura 29 – Curva de concentração de CaCl_2 na ação coagulante do extrato das sementes de *L. leucocephala*: as análises foram realizadas na temperatura de 50° C. As amostras R1", "R2" e "R3" representa análises em triplicatas da coagulação do leite em pó desnatado reconstituído. A amostra C representa o controle negativo da reação, em que fora adicionado o tampão tris – HCl, 50 mM, pH 8,0 ao leite em pó desnatado reconstituído. As letras do alfabeto (A, B, C, D e E) representa as reações em que foram adicionados CaCl_2 nas concentrações de 10 mM, 8mM, 6mM, 4mM e 2mM, respectivamente. A letra "F" equivale ao controle da reação (sem CaCl_2).



Fonte: elaborada pelo autor, 2023.

7. CONCLUSÃO

- A espécie vegetal descrita foi identificada como *L. leucocephala*;
- O extrato enzimático preparado com as sementes da *L. leucocephala* apresentou atividade amidásica;
- As sementes maduras de *L. leucocephala* mostrou atividade proteolítica em maior proporção que as sementes verdes;
- A serino protease presente mostrou ser específica para um único substrato conjugado com p-nitroanilina (BApNA);
- Apresentou temperatura ótima de 40°C e pH ótimo de 9,0, e em testes de estabilidades, a enzima se manteve estável em uma ampla faixa de pH (5.0 a 9.0) e temperaturas (40°C a 60°C);
- A atividade proteolítica aumentou na presença dos íons Na⁺, K⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺;
- A enzima demonstrou estabilidade e compatibilidade com detergentes e solventes orgânicos;
- A enzima foi majoritariamente inibida por PMSF (95,80%) seguido por Benzamidina (84,22%);
- Em teste de toxicidade com bioindicador, o extrato aquoso das sementes da *L. leucocephala* demonstrou atoxidade ou baixa toxicidade frente a *A. salina*;
- O estudo de aplicação biotecnológica proposta na pesquisa revelou elevada capacidade coagulante com extrato vegetal;
- A atividade coagulante do extrato bruto apresentou maior eficiência quando aquecido a 50°C;
- Em teste de curva de concentração de CaCl₂ a enzima eficiência catalítica em todas as concentrações testadas, inclusive na ausência de CaCl₂;

8. REFERÊNCIAS

ABAIR, A., HUGHES, C. E., BAILEY, D. The evolutionary history of *Leucaena*: Recent research, new genomic resources and future directions. **Trop. Grassl.** 7, 65-73, 2019.

ABEBE, B., e EMIRE, S. Manufacture of fresh cheese using east African **calotropis procera leaves extract crude enzymes as milk coagulant**. **Food Science & Nutrition**. 8, 4831-4842, 2020.

ABIA - **Relatório anual Associação Brasileira da indústria de Alimentos**. 2018. Disponível em: <https://www.abia.org.br/vsn/temp/z2019422RelatorioAnual2018.pdf>. Acesso em: 02 de outubro de 2023,

ABIA. **Industria de alimentos e bebidas: faturamento anual ultrapassa R\$ 1 trilhão, com aumento das vendas nos mercados internos e externo**. Disponível em: <https://www.abia.org.br/noticias/industria-de-alimentos-faturamento-anual-ultrapassa-r-1-trilhao-com-aumento-das-vendas-nos-mercados-interno-e-externo>. Acesso: 08 de Março de 2024.

ABIQUIM, **A trajetória da indústria química rumo à sustentabilidade**. Associação Brasileira da Industria Química. 2012.

AHMED, I., A. M., MORISHIMA, I BABIKER, E., E., MORI, N. Dubiumin, a chymotrypsin-like serine protease from the seeds of *Solanum dubium* Fresen. **Phytochemistry**. 70(4), 483- 491, 2009.

AHMED, I.A.M., BABIKER, E.E., MORI, N. 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, 2010.

AKBAR, M.A.; GUPTA, P.C. Mimosine in subabul (*Leucaena leucocephala*). **Ind. J. Anim. Sci.** 37, 287 – 289, 1984.

AKTAYEVA, S.; AKISHEV, Z.; KHASSENNOV, B. Proteolytic Enzymes in Cheese Making. **Eurasian J. Appl. Biotechnol.** 1, 10–16, 2018.

ALLEN, O.N.; ALLEN, E.K. *The Leguminosae: A Sourcebook of Characteristics, Uses and Nodulation*; University of Wisconsin Press: Madison, WI, USA, p 812, 1981

ALLIED MARKET RESEARCH - **Protease opportunity and industry forecast 2021 – 2030**. 2022. Disponível: <https://www.alliedmarketresearch.com/protease-market-A12830>, Acesso: 20 de julho de 2022.

ALLIED MARKET RESEARCH – **Enzymes Market Research, 2031**. 2022. Disponível: <https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-mar>. Acesso: 10 de julho, 2021.

ALMEIDA, C.M. e SIMÕES, I. Cardoon-Based Rennets for Cheese Production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 102, 4675-4686, 2018.

ALVES JS, REIS LBO, SILVA EKC, FABRICANTE JR, SIQUEIRA FILHO JA. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. In: FABRICANTE JR. **Plantas exóticas e exóticas invasoras da Caatinga**. Florianópolis: Bookes; 4:13-18. 2014.

ANTÃO, C., M. e MALCATA, F., X. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. **Plant Physiology And Biochemistry**. 43, 637-650, 2005.

ANGELIS, A. D. GASCO, L., PARISI, G., DANIELI, P., P. A multipurpose leguminous plant for the Mediterranean Countries: *Leucaena leucocephala* as an alternative protein source: A review. **Animalis**. 11, 2230, 2021.

ANTUNES, A., M., S., GUSMÃO, A., RABELLO, C., R., K., HOEFLE, D., SOUZA – AGUIAR, E., F., MENDES, F., M., L., PIMENTEL, F., A., CARIOCA, J., O., B., MARTINS, J., V., B., PAIVA, L., B., APPEL, L., G., ALMEIDA, M., F., L., LEAL, M., R., L., V., AZPIAZU, M., BEZERRA, M., A., JÚNIOR, N., P., GALERA, P., ALCÂTARA, P., CRAVEIRO, P., M., SEIDI, P., CORRÊA, R., G., C., LAGO, R., C., A., CARTAXO, R., MACABIRA, S. **Química verde no Brasil 2010 – 2030**. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos – CGEE. Brasília Distrito Federal, 2010

ARIMA K, UCHIKOBA T, YONEZAWA H, SHIMADA M, KANEDA M. Isolation and characterization of a serine protease from the sprouts of *Pleioblastus hindsii* Nakai. **Phytochemistry**. 54, 559–65, 2000.

ASMI, S., I., M., KUMAR, P., SHARMA, N., SAZILI, A., Q., LEE, S., ISMAIL-FITRY, M., R. Application of plant proteases in meat tenderization: Recent trends and future prospect. **Foods**. 12, 1336, 2023.

ATHANASIADOU, S., KYRIAZASKIS, I., JAKSON, F., COOP, R., L. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: In vitro and vivo studies. **Veter. Paras.** 99, 205- 219, 2001

BADGUJAR, K.C.; PAI, P.A.; BHANAGE, B.M. Enhanced biocatalytic activity of immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase under sonicated condition. **Bioprocess Biosyst. Eng.** 39, 211–221. 2016.

BAIN & COMPANY. **Indústria Química: importância, fatores de competitividade e implicações para o Brasil**. 2021. Disponível: <https://www.bain.com/pt-br/insights/industria-quimica---importancia-fatores-de-competitividade-e-implicacoes-para-o-brasil/#:~:text=A%20relev%C3%A2ncia%20da%20ind%C3%BAstria%20qu%C>

- 3%ADmica,e%20para%20o%20distanciamento%20social. Acesso: 22 de fevereiro de 2022.
- BAJPAI, P. Application of Enzymes in the Pulp and Paper Industry. **Biotechnol. Prog.** 15, 147–157, 1999.
- BANERJEE, P., GUPTA, B., M., GARG, K., C.. Patent statistics indicators of competition an analysis of patenting in biotechnology. **Scienmetrics.** 47(1), 97 – 116, 2000
- BARBERIS, S., QUIROGA, E. , MORCELLE, S., PRIOLO, N., LUCO J., M. Study of phytoproteases stability in aqueous-organic biphasic systems using linear free energy relationships. **J. Mol. Catal. B Enzym.** 38, 95–103, 2006.
- BARRET, A., J. Proteolytic enzymes: nomenclature and classification. In: Beynon, R.; Bond, J., S., **Proteolytic Enzymes: a practical approach (2 ed.)**. Oxford University Press, Oxford, 1-21, 2001
- BARROS, A., C., A. **Avaliação da atividade inseticida do colmo da *Guadua angustifolia* kunth contra *Tribolium castaneum* (Herbest)**. Tese de doutorado – Química. Universidade Federal de Alagoas, Maceió – Alagoas, 2022.
- BENGE, M.D.; CURRAN, H. The use of Leucaena for soil erosion control and fertilization. In *Leucaena Leucocephala: A Tree That Defies the Woodcutter*; Bengé, M.D., Ed.; Office of Agriculture, Development Support Bureau, Agency for International Development: Washington, DC, USA. 6, 1–13, 1981.
- BERG, J. M.; STRYER, L.; TYMOCZKO, JOHN L. **Bioquímica**. Reverté, 2007.
- BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol. Adv.** 18, 355–383, 2000.
- BILAL, M., ADEEL, M., RASHEED, T., ZHAO, Y., IQBAL, H., M., N. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation—a review. **Environment international**, 124, 336-353, 2019.
- BODE,W e SCHWAGER, P. The refined crystal structure of bovine β -trypsin at 1· 8 Å resolution: II. Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7· 0. **Journal of molecular biology**, v. 98, n. 4, p. 693-717, 1975.
- BRASIL, R., B., NICOLAU, E., S., CABRAL, J., F., SILVA, M., A., P. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. **Ciência Animal.** 25, 71 – 80, 2015.
- BRITO, ANA CATARINA FACUNDO DE; PONTES, DANIEL DE LIMA. **A evolução da Indústria Química**. Programa para Universidade a Distância. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2017.
- BRITO, M., A., BRITO, J., R., ACURI, E., F., LANGE, C., C., SILVA, M., R., SOUZA, N., G. Composição. **Embrapa**. 2020. Disponível em:

https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado_de_leite/pre-producao/qualidade-e-seguranca/qualidade/composicao. Acesso em: 03 de julho 2023.

BRITTEN, M. e GIROUX, H.J. Rennet coagulation of heated milk: a review. *Int. Dairy j.* 124, 105179, 2022.

BROYARD, C., E GAUCHERON, F. Modifications of structures and functions of caseins: A scientific and technological challenge. **Dairy Science e Technology.** 95, 831- 862. 2015.

BRUCKNER, C.H. **Fundamentos do melhoramento de fruteiras.** Viçosa: UFV, 2008. 200p.

BUDATHA, M., MEUR, G., DUTTA-GUPTA. Identification and characterization of midgut proteases in *Achaea janata* and their implications. **Biotechnol. Lett.** 30, 305-310, 2008,

CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresour. Technol.** 101, 4745–4766, 2010.

CHANCHAY, N. e POOSARAN, N. The reduction of mimosine and tannin contents in leaves of *Leucaena leucocephala*. *As. J. Food. Ang – Ind.* CHEN, X., FENG, F., LIU, Q., ZHANG, J. Degrading Mimosine and *Leucaena leucocephala* by Ensiling. **Applied Mechanics and Materials.** 618, 349 – 353, 2014.

CHAVÉZ, C., Y., L. **Efeito dos inibidores de proteases benzamidinas nas respostas bioquímica-fisiológicas de *Coffea Arabica* e da cochonilha *Coccus viridis*.** Dissertação de mestrado (Título de Mestre em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – Minas Gerais. 2016.

CHOI, J.-M.; HAN, S.-S.; KIM, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnol. Adv.** 2015, 33, 1443–1454.

CHOWTIVANNAKUL, P., SRICHAIKUL B., TALUBMOOK C.. Antidiabetic and antioxidant activities of seed extract from *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. **Agriculture and Naure Resources**, 50(5): 357 – 361, 2016.

CUI, H., WANG, L., YU, Y. Production and Characterization of Alkaline Protease from a High Yielding and Moderately Halophilic Strain of SD11 Marine Bacteria. **Journal Of Chemistry.** 2015, 1-8, 2015.

D`MELLO, J., P., F e THOMAS, D. Animal feed, In *Leucaena: Promising Forage and Tree Crops for the Tropics*; Rushkin, F.R., Ed; National Academy of Sciences: Washington, DC, USA, 302, 1977.

DALGLEISH, D., G. e CORREDIG, M. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing . **Annual Review of Food Science and Technology**. 3, 449 – 467, 2012.

DALGLEISH, D., G. On the structural models of bovine casein micelles: Review and possible improvements. **Soft Matter**. 7, 2265 – 2272, 2011.

DALZELL, S.A. Leucaena cultivars—current releases and future opportunities. **Trop. Grass**. 7, 56–64. 2019

DAS, N., MAITY, S., CHARKRABORTY, J., PAL, S., SARDAR, S., HALDER, U., C. Purification and characterization of a gelatinolytic serine protease from the seeds of ash gourd *Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**. 55, 77 – 87, 2018.

DE ANGELIS, A. **Una Leguminosa da Foraggio: Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit**; Aracne: Roma, Italy, 56, 2012

DEVLIN, T. M.; TOMA, L. **Manual de bioquímica: com correlações clínicas**. 2007.

DEWAN, S.S. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications; BCC Research: Wellesly, MA, USA, 2017.

DIAZ-MENDOZA, M., VELASCO-ARROYO, B., SANTAMARIA, M., E., GONZÁLES-MELENDI, P., MARTINEZ, M., DIAZ, I. Plant senescence and proteolysis: two processes with one destiny. **Genetics and molecular biology**. 39(3), 329- 338, 2016.

DIJKIMAN, M. Leucaena – A promising soil erosion control plant. **Econ. Bot.** 4. 337 – 349, 1950.

DINCER A, TELEFONCU A. Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads. **J Mol Catal B Enzym**. 45:10–4. 2007

DOUKYU, N e OGINO, H. Organic solvent – tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**. 48, 270 – 282, 2010.

DROHSE, H.B.; FOLTMANN, B. Specificity of Milk-Clotting Enzymes towards Bovine κ -Casein. Biochim. Biophys. **Acta BBA-Protein Struct. Mol. Enzym**. 995, 221–224, 1989.

ELAVARASAN, K.;e SHAMASUNDAR, B.A. Effect of oven drying and freeze drying on the antioxidant and functional properties of protein hydrosylates derived from freshwater fish (*Cirrhinus mrigala*) using papain enzyme. **J. Food Sci. Technol**. 53, 1303–1311. 2016

ELLEUCHE S, SCHRODER C, SAHM K, ANTRANIKIAN G. Extremozymes-biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. **Curr Opin Biotechnol.** 29C: 116–23, 2014.

EMBRAPA. **Misturas de enzimas mostrou alto desempenho para gerar etanol a partir do bagaço de cana.** Disponível: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/52639673/mistura-de-enzimas-mostrou-alto-desempenho-para-gerar-etanol-a-partir-de-bagaco-de-cana>. Acesso em: 20 de março de 2024.

EMBRAPA. **Leite baixo carbono.** Anuário leite 2023. 2023. Disponível em: <file:///C:/Users/josie/Downloads/Anuario-Leite-2023.pdf>. Acesso em: 23 de Março de 2024.

EMBRAPA. **Cadeia produtiva do leite no Brasil: produção primária.** Circula técnica 123. 2020.

EMBRAPA. **Tecnologia digitais contribuem para melhorar eficiência da produção de alimentos de forma mais sustentável.** Disponível: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/80271706/tecnologias-digitais-contribuem-para-melhorar-eficiencia-da-producao-de-alimentos-de-forma-mais-sustentavel>. Acesso em: 08 de Março de 2023.

ERLANGER, B., KOKOWSKY, N., COHEN, W. The Preparation and Properties of Two New Chromogenic Substrates of Trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 95, 271–278, 1961.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Milk and milk products.** Disponível: https://www.fao.org/3/cc8589en/cc8589en_milk.pdf. Acesso 08 de Março de 2024.

FARIAS, V., A., LIMA, A., D., R., COSTA, A., S., FREITAS, C., D., T., ARAÚJO, I., M., S., GARRUTI, D., S., FIGUEIREDO, E., A., T., OLIVEIRA, H., D. Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit as a new source of milk-clotting cysteine protease. **Food Research International**. 127, 108689, 2020.

FGUIRI, I., ATIGUI, M., SBOUI, A., SAMIRA, A., MARZOUGUI, C., DBARA, M., HAMMADI, M., KHORCHANI, T. Camel milk-clotting using plant extracts as a substitute to commercial rennet. **Journal of Chemistry**. 2021, 2021

FIGUEREDO, E., S., RODRIGUES, R., C., DE ARAÚJO, R., A., DOS SANTOS COSTAS, DE SOUZA SANTOS, F., N., DA SILVA, I., R., RIBEIRO DE JESUS, A., P., DOS SANTOS ARAUJO, J., DA SILVA CABRA, L., RIBEIRO ARAÚJO, I., G. Maturity dependent variation in composition and characteristics of potentially digestible tissues of leucena. **Sem. Ciênc. Agr Londrina**. 40, 3133 – 3142, 2019.

FOWDEN, L.; LEWIS, D.; TRISTRAM, H. Toxic amino acids: Their action as anti-metabolites. **Adv. Enz.** 1967, 29, 89–163, 1967.

FOX P., F, GUINEE T., P., COGAN T., M, MCSWEENEY P., L., H. Overview of cheese manufacture. In: Fundamentals of cheese science. **Springer US**, Boston, 11–25. (2017b).

FOX. P. F.; LAW, J. Enzimology of cheese ripening. **Food Biotech.** 5,(3), 239-262. 1991.

FRANÇA, P., C., R. **Caracterização bioquímica e molecular da tripsina do cecos pilóricos do Bijupirá (*Rachycentron canadum*) e sua compatibilidade com formulações de detergentes.** Tese (Doutorado em ciências biológicas) Universidade Federal de Pernambuco, Recife Pernambuco, 2013.

Franco A. A, Souto S. M. *Leucaena leucocephala*: uma leguminosa com múltiplas utilidades para os trópicos. Seropédica: **EMBRAPA-UAPNBS**, Comunicado Técnico, 2, 2:7. 1987.

GODSON A, VAN DER HOORN R.A.L. The front line of defence: a meta-analysis of apoplastic proteases in plant immunity. **Journal of Experimental Botany** 72, 3381–3394, 2021.

GOMES, E., GUEZ, M., A., U., MARTIN, N., SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química nova.** 30, 136 – 145, 2007.

GOMES, R. A. R., PITHAN E SILVA, R. O., VAN DENDER, A. G. F., ZACARCHENCO, P. B. (2017). O setor de produtos lácteos. In P. B. Zacarchenco, A. G. F. VAN DENDER & R. A. REGO (Eds.), **Brasil Dairy Trends**. Campinas: ITAL. (pp11-45) 2020.

GOMEZ-SANCHEZ, A., GONZALEZ-MELENDI, P., SANTAMARIA, M. E., ARBONA, V., LOPEZ-GONZALVEZ, A., GARCIA, A., et al. Repression of drought-induced cysteine-protease genes alter barley leaf structure and the response to abiotic and biotic stresses. **J. Exp. Bot.** 70, 2143–2155, 2019.

GONÇALVES, R., N., KALUME, D, L., FERRARA, M., A, SILVA – LOPES, R, E. A novel cucumisin – like serine protease from leaf of legume *Canavalia ensiformis*. **J. Plant Biochem Biotechnol.** 30, 147 – 159, 2020.

GRUDKOWASKA, M., e ZAGDANSKA, B. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. **Acta Biochim. Pol.** 51, 609 – 624, 2004.

GURUMALLESH, P., ALAGU, K., RAMAKRISHNAN, B., MUTHUSAMY S. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules.** 128, 247 – 267, 2019.

HARBOE, M., BROE, M.L., QVIST, K.B. The production, action and application of rennet and coagulants. In **Technology of Cheesemaking**, 2nd ed.; Law, B.A., Tamime, A.Y., Eds.; Blackwell Publishing Ltd.: Hoboken, NJ, USA. 98–129, 2010

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**. 102, 4501 – 4523, 2002.

HEGARTY, M.P.; COURT, R.D.; SCHINCKEL, P.G. Reaction of sheep to the consumption of *Leucaena glauca* Benth. and to its toxic principle mimosine. **Austr. J. Agric. Res.** 15, 153–167, 1964.

HEGARTY, M.P.; COURT, R.D.; THORNE, P.M. The determination of mimosine and 3,4-dihydropyridine in biological material. **Austr. J. Agric. Res.** 168 -179 , 1964.

HINTERWIRTH H, LINDNER W, LÄMMERHOFER, M. Bioconjugation of trypsin onto gold nanoparticles: Effect of surface chemistry on bioactivity. **Analytica Chimica Acta**. 733, 90 – 97, 2013.

HO, V. T. KAMEI, K. WADA, K. FUKUYAMA, K. SUZUKI, H. Thermal Denaturation and Renaturation of γ -Glutamyltranspeptidase of *Escherichia coli*. **JSBA**. 77, 409 – 412, 2013.

HOGO, F.; Tanaka, A.; Kawashima, Y.; Tarata, S.; Sunagawa, K. The effects of various kinds of mimosine reduced *Leucaena* meal on rats. **Jap. J. Zootech. Sci.** 59, 688–700, 1988.

HOLM L. G., PANCHO J. V., HERBERGER J. P., PLUNCKNETT D. L. A geographical atlas of world weeds. New York, USA: John Wiley and Sons 391. 1979.

HOLT, C. Casein and casein micelle structures, functions and diversity in 20 species. **International Dairy Journal**. V 60, 2 – 13, 2016.

HOLT, C., CARVER, J., A., ECROYD, H., THORN, D., C. Invited review: Caseins and casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods. **Journal of Dairy Science**. 96, 6127 – 6146, 2013.

HOSSAIN, M.A.; MUSTAFA, A.L.; ALAM, M.; KHAN, M.Z.A. Studies on the removal of mimosine from ipil-ipil (*Leucaena leucocephala*) seed. **J. Bangl. Chem. Soc.** 4, 83–85, 1991.

HYLIN, J.W. Biosynthesis of mimosine. **Phytochemistry**. 3, 1614, 1964.
HYLIN, J.W. Toxic peptides and amino acids in foods and feeds. **J. Agric. Food Chem**, 17, 492–496, 1969.

IKEGANI, F.; MIZUNO, M.; KIHARA, M.; MURAKOSHI, I. Enzymatic synthesis of the thyrotoxic amino acid mimosine from cysteine synthase. **Phytochemistry**. 29, 3461–3465, 1990.

JACOB, M.; JAROS, D.; ROHM, H. Recent Advances in Milk Clotting Enzymes. **Int. J. Dairy Technol.** 64, 14–33, 2011.

JELLOULI, K., BOUGATEF, A., DAASSI, D., BALTI, R., BARKIA, A., NASRI, M. New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (*Balistes caprisus*) with high activity at low temperature: Purification and characterization. **Food Chemistry**. 116, 644 – 650, 2009.

KALE, A., U. **Nutritive value of *Leucaena leucocephala* (subabul)**. Ph. D. Thesis, University of Bombay, Mumbai, India, 1987.

KAPOOR, S.; RAFIQ, A.; SHARMA, S. Protein engineering and its applications in food industry. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 2017, 57, 2321–2329.

KASSERR, H. P., e LAIDLER, K., J.. PH effects in trypsin catalysis. **Canadian Journal of Chemistry**. 47, 4021 – 4028, 1969.

KERMASHA, S e ESKIN, M. N. **Enzymes**. In: KERMASHA, S e ESKIN, M. N. Enzymes Novel Biotechnological Approaches for the Food Industry. 1 ed. Cambridge: Academic Press, cap 2, páginas, 15 – 44, 2021.

KISHIMURA, H., KLOMKLAO, S., BENJAKUL, S., CHUN, B. Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). **Food Chemistry**, v 106, p 194 – 199, 2008.

KISHIMURA, H., SEPPASITH, K., SOOTTAWAT, B., BYUNG – SOO, C. Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). **Food Chemistry**, 106, 1, 194-199, 2008.

KJELDSEN, F., SAVITSKI, M. M., NIELSEN, M. L., SHI, L., ZUBAREV, R. A. On studying protein phosphorylation patterns using bottom-up LC - MS/MS: the case on human. **The Analyst**, 132(8), 768. 2007.

KRUIF, C., G., e HOLT, C. Casein micelle structure, functions and interactions. In P. L. H. McSweeney e P. F. Fox (Eds), **Advance dairy chemistry**. 1 proteins, 3 rd., pp. 233 – 276). Boston: Springer US. 2003.

KUMAR, A.; GROVER, S.; SHARMA, J.; BATISH, V.K. Chymosin and Other Milk Coagulants: Sources and Biotechnological Interventions. **Crit. Rev. Biotechnol.** 30, 243–258, 2010.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial view point. **Biotechnology Advances**, 17, 561-594, 1999.

LADEIRA, S., A., DELATORRE, A., B., ANDRADE, M., V., V. Nota Científica: Utilização da pectina, proteínas do soro de queijo e água de maceração de milho para produção de proteases por *Bacillus* sp. termofílico. **Braz. J. Food Technol, Campinas**. 15, 92 – 98. 2012.

LAW BA, TAMIME A. Cheese-ripening and cheese flavour technology. Technology of cheesemaking. MA, USA: **Blackwell**. p. 231–359. 2010.

LEE, M.R. e LEE, W.J. The Role of Ca Equilibrium on the Functional Properties of Cheese: A Review. **Food Sci. Anim. Resour**, 29, 545–549, 2009.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. **Comput. Struct. Biotechnol. J.** 2, 201209017, 2012.

LI, T.; LIANG, J.; AMBROGELLY, A.; BRENNAN, T.; GLOOR, G.; HUISMAN, G.; LALONDE, J.; LEKHAL, A.; MIJTS, B.; MULEY, S.. Efficient, chemoenzymatic process for manufacture of the boceprevir bicyclic [3.1.0] proline intermediate based on amine oxidase-catalyzed desymmetrization. **J. Am. Chem. Soc**, 134, 6467–6472, 2012.

LI, Z., SCOTT, K., HEMAR, Y., ZHANG, H., OTTER, D. Purification and characterisation of a protease (tamarillin) from tamarillo fruit. **Food Chemistry**. 256, 228 – 234, 2018.

LIEW, W.H.; HASSIM, M.H.; NG, D.K.S. Review of evolution, technology and sustainability assessments of biofuel production. **J. Clean. Prod.**, 71, 11–29, 2014.

LIM, T.K.. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 2, Fruits. **Springer**, New York. 2012.

LINS, C. E. L., CAVALCANTE, U. M. T., SAMPAIO, E. V. S. B., MESSIAS, A. S., MAIA, L. C., Growth of mycorrhized seedlings of *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. In a copper contaminated soil. **Appl. Soil Ecol.** 31, 181 – 185, 2006.

LIU, H., HU, M., WANG, Q., CHENG, L., ZHANG, Z. Role of papain-like cysteine proteases in plant development. **Front. Plant Sci.** 9, 1717, 2018.
LO PIERO, A., R., PUGLISI, I., PETRONEL, G. Characterization of “Lettucine”, a serine – like protease from *Lactuca sativa* leaves, as novel enzyme for milk clotting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50, 2439 – 2443, 2002.

LOPEZ, P., GARCIA, M, M., TANEZ, R., TAPIAS, R., FERNANDEZ, M., DIAZ, M. J.. *Leucaena* species valoration for biomass and paper production in 1 and 2 year harvest. **Bioresour. Technol.** 99, 4846 – 4853. 2008.

LOU, S., N., HOU, F., J., REN, J., Z. Evaluation of grassland agricultural productivity by food equivalent unit. **Acta Pratac. Sin.** 28, 1 – 16, 2019.

LOWRY, J.B.; TAGENDJAJA, M.; TAGENDJAJA, B. Autolysis of mimosine to 3-hydroxy-4-1(h)pyridione in green tissues of *Leucaena leucocephala*. **J. Sci. Food Agric.** 34, 529–533, 1983

LOWRY, L. B., COOK, N., WILSON, R, D. Flavonol glycoside distribution in cultivars and hybrids of *Leucaena leucocephala*. **J. Sci. Food Agric.** 31, 401 – 407, 1984.

MADHAVAN, A., SINDHU, R., BINOD, P., K SUKUMARAN, R., PANDEY, A. Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications. **Bioresuor Technol.** 245, 1304 – 1313, 2017.

MALI, J.M.; KUTE, L.S.; JAMBHALE, N.D.; KADAM, S.S. Effect of heat processing on anti-nutrients in Leucaena seeds. **Ind. J. Anim. Sci.** 60, 383–385, 1990.

MANSUR, A., R.. A indústria de processamento químico no Brasil: suas motivações para pesquisa e desenvolvimento e suas interfaces com as políticas governamentais. **Química Nova**, 28, 104-106, 2005.

MAHSIN A., Z., NARSAH, E., MARZIAN, A., A., RAHIM, M., H., A., HUSSIN, A., S., M. Exploring the applications of plant-based coagulants in cheese production: review. 148, 105792, 2024.

MARES – GUIA, M., e SHAW, E. Studies on the active center of trypsin. The binding of amidines and guanidines as models of the substratesid chain. The **Journal of Biological Chemistry**. 240, 1579 – 1585, 1965.

MAROUF, H.M. Effect of Pregabalin Premedication on Emergence Agitation in Children after Sevoflurane Anesthesia: A Randomized Controlled Study. **Anesth. Essays Res.** 2018, 12, 31–35.

MAY O: industrial Enzyme Applications – Overview and Historic Perspective. Industrial Enzyme Applications. Jonh Wiley e Sons, Ltd; 24. 2019

MEENA DEVI VN, ARIHARAN VN, NAGENDRA PRASAD. Nutritive value and potential uses of Leucaena leucocephala as biofuel - A mini review. Research **Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences** 4(1): 515-521, 2013.

MENDES, L., AMORIM – BORTHER, B., LAGE, C.. Patent applications on representative sectores of biotechnology in Brazil: an analysis of the last decade. **Journal of Technology Management & Innovation**. 8(4), 91 – 102, 2013.

MEROPS. Families of Proteolytic Enzymes. Disponível em: https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/family_index?type=P. Acesso em 07 de agosto 2022.

MEYER, B.N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plantconstituents. **Planta medida**, 45, 31-34, 1982.

MILKPOINT. **Caminhos para o crescimento na indústria do queijo no brasil**. 2022. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/caminhos-para-o-crescimento-na-industria-do-queijo-no-brasil-229365/>. Acesso em 08 de julho 2023.

MILKPOINT. **IBGE: 2º trimestre com captação de leite alta**. 2023. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/panorama-mercado/ibge-2-trimestre-com-captacao-de-leite-em-alta-234944/>. Acesso em 23 de Março de 2024.

MONTEIRO, V., N. e SILVA, R., N. **Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática**. Senai – Revista de Processos Químicos. 2009.

MORENO-HERNÁNDEZ, J., M., M., HERNÁNDEZ-MANCILLAS, X., D., NAVARRETE, E., L., C., MAZORRA-MANZANO, M., G., OSUNA-RUIZ, I., RODRÍGUEZ-TIRADO, V., F., SALAZAR-LEYVA, J., A. Partial characterization of the proteolytic properties of an enzymatic extract from “aguama” *Bromelia pinguin* L. fruit grown in Mexico. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 182, 181 – 196, 2017.

MÓTYÁN, J. A., TÓTH, F., TÖZSÉR, J.. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. **Biomolecules**. 3, 923 – 942, 2013.

MOUDRA K, PACHLOVA V, CERN IKOVA M, SOPIK T, BUNKA F. The combined effects of fat content, calcium chloride, and coagulant concentration on the development of cheese curd structure. **Int Dairy J**. 73:92–97, 2017.

MURI, E. M. F.. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptideomiméticos. **Química Nova**, 37(2), 308 – 316, 2014.

MUTHU, S., GOPAL, V., B., SOUNDARARAJAN, S., NATTARAYAN, K., NARAYAN, K., S., LAKSHMIKANTHAN, M., MALAIRAJ, S., PERUMAL, P. Antibacterial, serine protease from *Wrightia tinctoria*: Purification and characterization. **Plant Physiology and Biochemistry**. 112, 161 – 172, 2017.

NASCIMENTO, M., C., ALENCAR, V., N., S., NASCIMENTO, T., P., BATISTA, J., M., S., PORTO, A., L., F. **Proteases e suas aplicações biotecnológicas nas indústrias alimentícias**. II Congresso Internacional da Agroindústria. 2021.

National Academy of Sciences. Firewood Crops: Shrub and Tree Species for Energy Production; National Academy of Sciences: Washington, DC, USA, 237, 1980.

NGUYEN, B., C., Q e TAWATA, S. The chemistry and biological activities of mimosine: A review. **Phytotherapy Research**. 30(8) 1230-42, 2016.

NEHDI, I.A., SBIHI, H., TAN, C.P., AL-RESAYES, S.I. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit seed oil: characterization and uses. **Ind. Crops Prod**. 52, 582–587, 2014.

NICOSIA, D., F., PUGLISI, I., PINO, A., BAGLIERI, A., LA CAVA, R., CAGGIA, C., CARVALHO, A., F., RANDAZZO, C., L. An easy and cheap kiwi-based preparation as vegetable milk coagulant: preliminary study at the laboratory scale. **Foods**.11, 2255, 2022.

NUGROHO, D., F., SURANINDYAH, Y., Y., ASTUTI, A. The effect of supplementation of *Leucaena leucocephala* leaf in Friesian Holstein cows ration on milk production and composition. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. 387, 2019.

OLIVEIRA, E., M.. **Purificação e caracterização de uma carboxipeptidase e de uma dipeptidase da larva de *Tenebrio molitor* (Coleoptera)**. Dissertação, Programa de Pós – graduação em ciências biológicas (bioquímica), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PANDEY, V.C e KUMAR, A., *Leucaena leucocephala*: an underutilized plant for pulp and paper production. **Genet. Resour. Crop Evol.** 60: 1165– 1171. 2013. PANESAR, P.S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Biotechnological approaches for the production of prebiotics and their potential applications. **Crit. Rev. Biotechnol.** 33, 345–364, 2013.

PANICKER, L., M., USHA, R., ROY, S., MANDAL, C. Purification and characterization of a serine protease (CESP) from mature coconut endosperm. **BCM Research Notes**. (81) 2009.

PERE. P., E., C., FU, J., ZERO, D. T., CURY, J., A., Effect of phenylmethylsulfonyl fluoride, a protease inhibitor, on enamel surface remineralization. *Brazilian Journal of Oral Sciences*. 22, 1-10, 2023

PHESATCHA, K e WANAPAT, M. Improvement of Nutritive Value and In vitro Ruminal Fermentation of *Leucaena* Silage by Molasses and Urea Supplementation. **Asian – Australas J Anim Sci.** V 29, 1136 – 1144, 2016.

PIERO, A.R.L.; PUGLISI, I.; PETRONE, G. Characterization of the Purified Actinidin as a Plant Coagulant of Bovine Milk. **Eur. Food Res. Technol.** 233, 517–524. 2011.

PRAKASH, O.; JAISWAL, N. Alpha-Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. **Applied Biochemical and Biotechnology**. 160, 2401-2414, 2009.

PRAXEDES-GARCIA, P., CRUZ-SILVA, I., GOZZO, A., J., NUNES, V., A, TORQUATO, R., J., TANAKA, A., S., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R., C., GONZALEZ, Y., G., ARAUJO, M., S. Biochemical Aspects of a Serine Protease from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) Seeds: A Potential Tool to Access the Mobilization of Seed Storage Proteins. **The Scientific World Journal**. Pages 8, ID 562715, 2012.

PRAZERES, J.N.; CRUZ, J.A.B.; PASTORE, G.M. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. *SciELO. Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo.37(4) 505-509 2006.

RAJAGOPALAN, A., SUKUMARAN, B., O. Three phase partitioning to concentrate milk clotting proteases from *Wrightia tinctoria* R. Br. and its characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**. 118, 279 – 288, 2018.

RANADHEERA, C. S., LIYANAARACHCHI, W. S., CHANDRAPALA, J., DISSANAYAKE, M., VASILJEVIC, T. Utilizing unique properties of caseins and the casein micelle for delivery of sensitive food ingredients and bioactives. **Trends in Food Science & Technology**, 57, 178-187, 2016.

RAO, M. B., TANKSALE, A. M., GHATGE, M. S., DESHPANDE, V.. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 62, 597 – 635, 1998.

RAWALIYA, R., K., PATIDAR, P., SHARMA, S., HAJELA, K. Purification and biochemical characterization of protease from the seeds of *Cyamopsis tetragonoloba*. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**.10,172-180, 2022.

RITCHIE, D. B. e WOODSINDE, M. T. Probing the structural dynamics of proteins and nucleic acids with optical tweezers. **ELSEVIER**, 34, 43 – 5, 2015
ROBINSON, P., K.. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**. 59, 1 – 41, 2015.

ROGELJ, I., PERKO, B., FRANCKY, A., PENCA, V., PUNGERCAR, J.. Recombinant lamb chymosin as an alternative coagulating enzyme in cheese production. **J Dairy Sci**. 84,1020-1026, 2001.

ROSIDA, D. F., DJAJATI, S., NILAMAYU Z. A., ROSIDA. Antibacterial Activity of *Leucaena leucocephala* Extracts on Growth of *Escherichia coli*. **Advanced Science Letters**. 23(12): 12268 – 12271, 2018.

ROY, I e PRASAD, S. Converting Enzymes into Tools of Industrial Importance. Recent Pat. **Biotechnol**.12, 33–56, 2017

SANATAN, P., T., LOMATE, P., R., GIRI, A., P., HIVRALE, V., K. Characterization of a chemostable serine alkaline protease from *Periplanta améríca*. **BCM Biochemistry**.14, 32, 2013.

SANTOS, C., W., V. **Serino protease e inibidor de tripsina: purificação, caracterização aplicação biotecnológica**. Tese de doutorado – Química. Universidade Federal de Alagoas, Maceió – Alagoas, 2020.

SHARMA, M., GAT, Y., ARYA, S., KUMAR, V., PANGHAL, A., KUMAR, A. A review on microbial alkaline protease: an essential tool for various industrial approaches. **Industrial Biotechnonology**. 15, n 2, 2019.

SANTOS, D., M., R., C., SANTOS, C., W., V., SOUZA, C., B., ALBUQUERQUE, F., S., OLIVEIRA, J., M., S., PEREIRA, H., J., V. Tripisin purified from *Coryphaena hippurus* (common dolphinfish): Purification,

characterization, and application in commercial detergents. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. p101584, 2020.

SANTOS, M., A. **Avaliação de atividade coagulante do extrato de sementes da chia (*Salvia hispânica* L) no leite bovino**. Dissertação de mestrado – Química. Universidade Federal de Alagoas, Maceió – Alagoas, 2023.

SCAPINELLO, C., FURLAN, A., C., JOBIM, C., C., DE FARIA, A., G., FIGUREDO, D., F., HERNANDES, A., B. Valor nutritivo e utilização do feno de leucena (*Leucaena leucocephala* cv. Cunningham) para Coelho sem crescimento. **Acta Scient.** 22, 829 – 833, 2000.

SETHI, P. **Nutritional and Biochemical Aspects of *Leucaena leucocephala***. Ph.D. Thesis, University of Bombay, Department of Chemical Technology, Bombay, India, 1989.

SEBRAE. **Programa de leite e derivados do Sebrae Alagoas**. 2023.

Disponível em:

[https://sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/ufs/al/artigos/programa-de-leite-e-derivados-do-sebrae-](https://sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/ufs/al/artigos/programa-de-leite-e-derivados-do-sebrae-alagoas,c8867922de8bd710VgnVCM100000d701210aRCRD)

[alagoas,c8867922de8bd710VgnVCM100000d701210aRCRD](https://sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/ufs/al/artigos/programa-de-leite-e-derivados-do-sebrae-alagoas,c8867922de8bd710VgnVCM100000d701210aRCRD). Acesso em: 22 de Março de 2023.

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.

SHARMA, A., KUMARI, M., JAGANNADHAM, M., V. Religiosin C, a cucumisina-like serine protease from *Ficus religiosa*. **Process Biochemistry**. 47, 914 – 921, 2012.

SHARMA, P.; NATH, A. K.; KUMARI, R.; BHARDWAJ, S. V. Purification, characterization and evaluation of insecticidal activity of trypsin inhibitor from Albizia lebbeck seeds. **Journal of Forestry Research**, 23, 1,131–137, 2012

SHE L, C., LIU C. M., CHEN C. T., LI H. T., LI W. J. et al. The anticancer and anti - metastasis effects of phytochemical constituents from leucaena leucocephala. **Biomedical Research (Indian)** 28(7) 2893 – 2897, 2017.

SILVA – LOPES, R., E., VIDAL, N., M., GONÇALVES, R., N. Perfil proteolítico de extrato aquoso de folhas e sementes de *Macuna pruriens* (L) DC. **Revista Fitos**. 10 (4), 375 – 547, 2016.

SILVA, A. V. NASCIMENTO, J. M., RODRIGUES, C. H. NASCIMENTO, D. C. S. COSTA, R. M. P. B. MARQUES, D. A. V. LEITE, A. C. L. FIGUEREDO, M. V. B. PASTRANA, L. CONVERTI, A. NASCIMENTO, T. P., PORTO, A. L. F. Partial purification of fibrinolytic and fibrinogenolytic protease from *Gliricidia sepium* seeds by aqueous two-phase system. **Elsevier**. 27. 101 – 669, 2020.

SILVA, A., C., O. e CORTEZ, M., A., S. **Tecnologia de leite e derivados lácteos**. EDUFF – Universidade Federal Fluminense. 2022.

SILVA, D., I., S. **Avaliação de bioensaio das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam . (in vivo e in vitro)**. Dissertação de mestrado – Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2012.

SILVA, N. R. **A indústria química no Brasil nos anos recentes: crise e oportunidades**. TCC (Trabalho de Conclusão de Curso – Engenharia Química) Faculdade de Federal Uberlândia, Uberlândia – Minas Gerais, 2018.

SINGH, M.K., SINGH, J., KUMAR, M., THAKUR, I.S. Novel lipase from basidiomycetes *Schizophyllum commune* ISTL04, produced by solid state fermentation of *Leucaena leucocephala* seeds. **J. Mol. Catal. B Enzym.** 110, 92–99, 2014.

SIQUEIRA, K., B. O mercado consumidor de leite e derivados. **Embrapa circular técnico**, Juiz de Fora, MG. 2019.

SIRITAPETAWE, J., THUMANU, K., SOJIKUL, P., THAMMASIRIAK., S. A novel serine protease with human fibrinolytic activities from *Artocarpus heterophyllus* latex. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**. 1824, 907 – 912, 2012.

SOUZA, R., C., P., SANTOS, D., C., NERVES, L., T., B., C., CHAGAS, E., A. Tecnologia de bioprocesso para produção de alimentos funcionais. **Revista Agro@mbiente.** ,7(3), 366-372, 2013.

SRILAKSHMI, J., MADHAVI, J., LAVANYA, S., AMMANI, K. Commercial potential of fungal protease: past, present and future prospects. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences.** 2, 2018 – 234, 2015.

STANDLEY, P., C. **Contributions from the National Herbarium. Trees and Shrubs of Mexico**; Government Printing Office: Washington DC. USA, Volume 23, 1721, 1922.

SUBSSAY, H., K. **Determinação de temperatura ótima e pH ótimo das celulasas produzidas por *penicillium* sp.** Fsde 15. Trabalho de Conclusão de Curso – Engenharia Química. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, Paraíba. 2022.

SUMANTHA, A., LARROCHE, C., PANDAY, A.. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food – Grade Protease: A Perspective. **Food Technology and Biotechnology.** 44: 211 – 220, 2006.

TAGENDJAJA, B.; LOWRY, J.B.; WILLIS, R.B.H. Isolation of a mimosine degrading enzyme from *Leucaena* leaf. **J. Sci. Food Agric**, 37, 523–526, 1986.

TAGENDJAJA, B.; LOWRY, J.B.; WILLIS, R.B.H. Optimisation of conditions for degradation of mimosine in *Leucaena leucocephala* leaf. **J. Sci. Food Agric.** 35, 613–616, 1984.

TAREK, H., NAM, K., B., KIM, Y., K., SUCHI, S., A., YOO, J., C.. Biochemical characterization and application of a detergent stable, antimicrobial and antibiofilm potential protease from *Bacillus siamensis*. **International Journal of Molecular Sciences**. 24(6), 5774, 2023.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnol. Adv.**28, 628–634, 2010.
TER MEULEN, U.; STRUCK, S.; SCHULKE, E.; EL-HARITH, E.A. A review on the nutritive value and toxic aspects of *Leucaena leucocephala*. **Trop. Anim. Prod.** 4, 113–126, 1979.

THERON, L., W. e DIVON., B.. Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 98: 8853 – 8868, 2014.

TOMAR, O.S e GUPTA, R.K. Performance of some forest tree species in saline soils under shallow and saline watertable conditions. **Plant Soil**. 1985, 87, 329–335.

TOMAR, R., KUMAR, R., JAGANNADHAM, M. V. A stable serine protease, wrightin, from the latex of the plant *Wrightia tinctoria* (Roxb.) R. Br.: purification and biochemical properties. **Journal of agricultural and food chemistry**, 56(4),1479-1487, 2008.

TORNKVIST, A., LIU, C., AND MOSCHOU, P. N. Proteolysis and nitrogen: emerging insights. **J. Exp. Bot.** 70, 2009–2019, 2019.

TRONCOSO, F., D., SÁNCHEZ, D., A., FERREIRA, M., L. Production of plant proteases and new biotechnological applications: an updated review. **Chemistryopen**.11, Issue 3, 2022.

UCHIKOBA T, YONEZAWA H, KANEDA M. Cleavage specificity of cucumisin, a plant serine protease. **J Biochem**. 117, 1126–30, 1995.

VANDENBERGHE, L., P., S., KARP, S., G., PAGNONCELLI, M., G.,B., TAVARES, M., V., L., JUNIOR, N., L., DIESTRA, K., V., VIESSER, J., A., SOCCOL, C,R. Chapter 2 – Classification of enzymes and catalytic properties. **Biomass, Biofuels, Biochemicals**. 11 - 30– 2020.

VAN BEUZekom, B & ARUNDEL, A.. OECD **Biotechnology Statistics**. **OECD, 2009**. [Acesso em 05 de fevereiro 2022]. Disponível em: <https://www.oecd.org/sti/42833898.pdf>

VAN DEN BELDT, R.J.; BREWBAKER, J.L. *Leucaena* Wood Production and Use; Nitrogen Fixing Tree Association: Waimanalo, HI, USA, 1985; p. 50
VAN DER HOON, R., A. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. **Annu. Rev. Plant Biol.** 59, 191 – 223, 2008.

VERMA, V.K., RANI, K.V., KUMAR, S.R., PRAKASH, O. *Leucaena leucocephala* pod seed protein as an alternate to animal protein in fish feed and

evaluation of its role to fight against infection caused by *Vibrio harveyi* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Fish. Shellfish Immunol.** 76, 324–332, 2018.

VIETMEYER, N., COTTOM, B., RUSKIN, F., R. Leucaena, Promising Forage and Tree Crop for the Tropics; National Academy Press: Washington, DC, USA, 155, 1977.

WAN NADILAH, W. A., KHOZIRAH, S., KHATIB, B., HAMID, M., et al Evaluation of the α -glucosidase inhibitory and free radical scavenging activities of selected traditional medicine plant species used in treating diabetes. **International Food Research Journal.** 26(1): 75 – 85, 2019.

WANG, C., ZENG, Z., SU, X., LAKSHMANAN, P., SHAN, W., KUANG, J., LU, W., CHEN, J., ZHAO, Y. A transcriptional repressor BrDof2.4 regulates protease genes involved in postharvest leaf senescence in Chinese flowering cabbag. 181, 111680, 2021.

WANI, S., S. e MASHRU, R., C. Sensitive and selective methods for determination of proteolytic activiti of formulation containing bromelain and trypsin as proteolytic enzymes. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.** 5 (11), 4838 – 4845, 2014.

WEE, K.L.; WANG, S. Effect of post-harvest treatment on the degradation of mimosine in *Leucaena leucocephala* leaves. **J. Sci. Food Agric.** 39, 195–201, 1987.

YADAV, S., C., PANDE, M., JAGANNADHAM, M., V. Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant. *Euphorbia milii*. **Phytochemistry.** 67, 1414 – 1426, 2006.

YANG, H., REN, X., ZHAO, Y., XU, T., XIAO, J., CHEN, H. Enhancing alkaline protease stability through enzyme-catalyzed crosslinking and its application in detergents. **Processes.** 12(3), 624, 2024.

ZAYED, MOHAMED Z, SALLAM SMA, SHETTA ND Review Article on *Leucaena Leucocephala* As One of the Miracle Timber Trees. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** 10(1): 1, 2018

ZAYED, MOHAMED ZAKY, SAMLING B. Phytochemical constituents of the leaves of *Leucaena leucocephala* from Malaysia. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** 8(12): 174-179, 2016.

ZHANG, B.; WENG, Y.; XU, H.; MAO, Z. Enzyme immobilization for biodiesel production. **Appl. Microbial. Biotechnol**, 93, 61–67. 2012.

ZHANG, Y., XIA, Y.; LIU, X., XIONG, Z., WANG, S., ZHANG, N.; AI, L. High-Level Expression and Substrate-Binding Region Modification of a Novel BL312

Milk-Clotting Enzyme to Enhance the Ratio of Milk-Clotting Activity to Proteolytic Activity. **J. Agric. Food Chem.** 67, 13684–13693, 2019.

ZHENG, X., SHI, X., WANG, B. A review on the general cheese processing technology, flavor biochemical pathways and the influence of yeasts in cheese. **Frontiers in Microbiology**. 12, 703284, 2021.