



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
CIÊNCIA DE ALIMENTOS



GABRIELA MURICY DE SOUZA SILVA

OBTENÇÃO DE PROTEASES DA ALCACHOFRA (*Cynara scolymus* L.) E
PURIFICAÇÃO PARCIAL EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL

2023

GABRIELA MURICY DE SOUZA SILVA

**OBTENÇÃO DE PROTEASES DA ALCACHOFRA (*Cynara scolymus* L.) E
PURIFICAÇÃO PARCIAL EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos para obtenção do Título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dr.^ª Renata Cristina Ferreira Bonomo.

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Soares Santos

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL

2023

660.634 Silva, Gabriela Muricy de Souza.
S58o Obtenção de proteases da alcachofra (*Cynara scolymus* L.) e purificação parcial em sistemas aquosos bifásicos. / Gabriela Muricy de Souza Silva. – Itapetinga-BA: UESB, 2023.

124f.

Tese apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos para obtenção do Título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Engenharia de Alimentos. Sob a orientação da Prof.^a D. Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e coorientação do Prof. D. Sc. Leandro Soares Santos.

1. Enzimas – Extração e purificação. 2. Proteases - Extração - Alcachofra. 3. Proteases – Purificação - Sistema aquoso bifásico. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. III. Santos, Leandro Soares. IV. Título.

CDD(21): 660.634

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5^a Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Proteases vegetais – Extração e purificação
2. Sistema aquoso bifásico
3. *Cynara cardunculus* L. var *scolymus*

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “OBTENÇÃO DE PROTEASES DA ALCACHOFRA (*Cynara scolymus* L.) E PURIFICAÇÃO PARCIAL EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS”.

Autor (a): GABRIELA MURICY DE SOUZA SILVA

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo

Coorientador (a): Prof. Dr. Leandro Soares Santos

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de ***DOCTORA EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE ALIMENTOS***, pela Banca Examinadora.

Documento assinado digitalmente
 VANESSA SANTOS SAMPAIO
Data: 30/01/2024 17:40:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Vanessa Santos Sampaio
UESB

Documento assinado digitalmente
 EVALDO CARDOZO DE SOUZA JUNIOR
Data: 30/01/2024 15:46:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Evaldo Cardozo de Souza Júnior
UESB

Documento assinado digitalmente
 ROSANA MOURA DE OLIVEIRA
Data: 29/01/2024 22:03:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Rosana Moura de Oliveira
IF-BAIANO

Documento assinado digitalmente
 OLGA REINERT RAMOS GANDOLFI
Data: 17/01/2024 15:25:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr.^a Olga Reinert Ramos Gandolfi

Documento assinado digitalmente
 RENATA CRISTINA FERREIRA BONOMO
Data: 13/01/2024 11:16:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo
Orientadora - UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 01 de dezembro de 2023.

*“Nem toda palavra é aquilo que o dicionário diz,
Nem todo pedaço de pedra se parece com tijolo ou com pedra de giz,
Avião parece passarinho que não sabe bater asa,
Passarinho voando longe, parece borboleta que fugiu de casa,
Borboleta parece flor que o vento tirou pra dançar,
Flor parece a gente, pois somos semente do que ainda virá...
Descobrir o verdadeiro sentido das coisas
É querer saber demais”*

Sonho de Uma Flauta – O Teatro Mágico

*Dedico,
À Deus,
À minha Irmã Luísa,
À AL Muricy.*

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha Mãe Joana.

À minha irmã Luísa.

À minha luz, vó Helena.

Aos meus filhos.

Aos meus amigos(as).

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Renata Bonomo por toda nossa jornada juntas.

Aos colegas e professores que contribuíram no trabalho. Em especial ao prof. Dr.

Leandro Soares pelos ensinamentos.

Aos responsáveis pelos laboratórios que foram realizadas as análises.

Aos funcionários da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB).

Aos integrantes da banca examinadora, professores, Doutores Vanessa Sampaio, Rosana Oliveira, Olga Gandolfi e Evaldo Cardozo pela disponibilidade e considerações.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB).

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (PPGECAL).

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

À todas as pessoas que me inspiraram e apoiaram.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE QUADROS	14
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES	15
LISTA DE SÍMBOLOS	17
RESUMO	19
ABSTRACT	19
CAPÍTULO 1	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1. Enzimas	25
2.2. Enzimas Proteolíticas.....	27
2.2.1. Fontes de obtenção de enzimas proteolíticas	29
2.2.2. Extração de proteases de fontes vegetais.....	30
2.2.3. Aplicação de enzimas proteolíticas vegetais em alimentos	36
2.3. Alcachofra (<i>Cynara cardunculus</i> L. var <i>scolymus</i>).....	38
2.3.1. Divisão, colheita e produção da alcachofra	38
2.3.2. Valores nutricionais e medicinais da alcachofra.....	39
2.3.3. Utilização da alcachofra na indústria de alimentos.....	41
2.4. Extração Líquido-Líquido	41
2.4.1. Sistemas Aquosos Bifásicos	43
2.4.1.1. Parâmetros de partição em Sistemas Aquosos Bifásicos.....	44
2.4.1.2. Aplicação de sistemas aquosos bifásicos na purificação de biomoléculas	46
3. OBJETIVOS	53
3.1. Objetivo geral.....	53
3.2. Objetivos Específicos	53
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
CAPÍTULO 2	69
ABSTRACT	70
RESUMO	71
1. INTRODUCTION	72
2. MATERIAL AND METHODS	74
2.1. Material and location of the research.....	74
2.2. Extracts of artichoke leaves	74

2.3. Protein determination.....	74
2.4. Determination of proteolytic and specific activity	75
2.5. Milk clotting activity and rennet replacement potential	75
2.6. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) of artichoke leaves extracts ...	76
2.7. Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of artichoke leaves extracts	76
2.8. Statistical analysis.....	77
3. RESULTS AND DISCUSSION	78
3.1. Proteins, proteolytic and specific activity of artichoke leaves extracts	78
3.2. Coagulation activity and rennet substitution potential of artichoke leaves extracts .	80
3.3. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	81
3.4. Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of artichoke leaves extracts	85
3.5. Principal Component Analysis (PCA).....	86
4. CONCLUSION	90
5. REFERENCE.....	91
CAPÍTULO 3	95
RESUMO	96
1. INTRODUÇÃO.....	98
2. MATERIAL E MÉTODOS	100
2.1. Material e local da pesquisa	100
2.2. Extrato das folhas da alcachofra.....	100
2.3. Preparo dos Sistemas Aquosos Bifásicos e planejamento experimental	100
2.4. Determinação do teor de proteínas	101
2.5. Determinação da atividade proteolítica e específica	102
2.6. Determinação dos parâmetros de partição	102
2.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	104
2.8. Cromatografia de Exclusão Molecular (CEM)	104
2.9. Análise estatística	104
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	106
3.1. Partição das proteases das folhas da alcachofra por Sistemas Aquosos Bifásicos..	106
3.2. Efeito das variáveis independentes no coeficiente de partição das proteínas e da atividade enzimática	111
3.3. Efeito das variáveis independentes na seletividade.....	112
3.4. Efeito das variáveis independentes no fator de purificação e índice de recuperação teórica	113
3.5. Efeito das variáveis independentes na energia livre de transferência de Gibbs.....	114

3.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia de Exclusão Molecular (CEM).....	115
4. CONCLUSÃO	119
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. O esquema ilustra a interação entre a enzima e substrato para formação do produto.	26
Figura 2. Partes da alcachofra (<i>Cynara scolomys</i>).	38
Figura 3. Produção da alcachofra no mundo.	39
Figura 4. Gráfico de rede com palavras-chaves verificadas na base de dados Scopus.....	40
Figura 5. Artigos publicados entre os anos de 1992 e início de 2023.	46
Figura 6. Gráfico de rede com palavras-chaves utilizadas em artigos da área de pesquisa.	50
Figura 7. Gráfico de rede com países que concentram as pesquisas na área.	51
Figura 8. Diagrama de agrupamento de palavras-chaves dos últimos anos para os artigos publicados.....	52

CAPÍTULO 2

Figura 1. HPLC chromatogram of protein extracts from artichoke leaves using the mechanical stirring method. Citrate-MS (black), Acetate-MS (red) and Tris-MS (green)..	82
Figura 2. HPLC chromatogram of extracts of protein from artichoke leaves using the ultrasound method. Citrate-US (black), Acetate-US (red) and Tris-US (green).	84
Figura 3. Electrophoretic profile (SDS-PAGE) of the artichoke leaves extracts, (1) Citrate-AM; (2) Acetate-AM; (3) Tris-AM; (4) Citrate-US; (5) Acetate-US; (6) Tris-US. (P) molecular protein marker (6.5 to 200 kDa).	86
Figura 4. Scatter plot of Principal Components 1 and 2 of protein extracts from Artichoke leaves by the method of mechanical stirring and ultrasound according to the data obtained by HPLC. Black symbols: Mechanical extraction; Red symbols: Extraction by ultrasound.	88

CAPÍTULO 3

Figura 1. Efeito da concentração de PEG (%) e pH no coeficiente de partição da proteína (a) e coeficiente de partição da atividade enzimática (b).	112
Figura 2. Efeito da concentração de PEG (%) e pH na seletividade.	113

Figura 3. Efeito da concentração de PEG (%) e pH no fator de purificação (a) e recuperação teórica enzimática (b).....	114
Figura 4. Efeito da concentração de PEG (%) e pH na variação de Energia Livre de Transferência de Gibbs.	115
Figura 5. Cromatograma de CLAE do extrato (EXT-FA) de proteína das folhas de alcachofra e a fase superior (SIST4FS) e fase inferior (SIST4FI) do sistema.	116

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Mean protein values, proteolytic and specific activity of the extracts obtained from the artichoke (*Cynara scolymus*) leaves by the mechanical stirrer and ultrasonic method..78

Tabela 2. Coagulation activity of artichoke leaf extracts (*Cynara scolymus*) in cow's milk and its rennet potential for curd replacement.80

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Planejamento experimental para partição da protease das folhas da alcachofra.101

Tabela 2. Resultados dos parâmetros da partição da protease das folhas da alcachofra...106

Tabela 3. Modelos estatísticos referentes as variáveis respostas com seus respectivos resultados.....110

Tabela 4. Massas molares do extrato das folhas da alcachofra e da fase superior e inferior do sistema C_{PEG} 10,5%, C_{SAL} 9%, e pH 8.....118

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Fontes e classificação de proteases vegetais, forma de extração, e autores de diferentes lugares do mundo.....	31
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

UESB – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

BA – Bahia

SP – São Paulo

BR – Brasil

S – Sul

W – Oeste

CAS – Números de identificao de uma substância química

AM – Agitao Mecânica

MS – Mechanical stirring

US – Ultrassom

DP – Determinao Proteínas

AP – Atividade Proteolítica

PA – Proteolytic activity

AE – Atividade Específica

SA – Specific activity

ACL – Atividade de Coagulao do Leite

MCA – Milk clotting activity

PSC – Potencial de Substituio do Coalho

RSP – Rennet Substitution Potential

BSA – Bovine Serum Albumin

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

RP-HPLC – Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography

ACP – Análise de Componentes Principais

PCA – Principal Component Analysis

UV – Visible Ultraviolet

DAD – Diode Array Detector

ANOVA – Análise de variância

SAS – Statistical Analysis System

ELLC – Extrao líquido-líquido convencional

SAB – Sistemas Aquosos Bifásicos

PEG – Polietileno glicol

C_{sup} – Concentração das proteínas na fase superior

C_{inf} – Concentração das proteínas na fase inferior

A_{sup} – Atividade enzimática na fase superior

A_{inf} – Atividade enzimática na fase inferior

AE_{ext} – Atividade específica do extrato bruto

R^2 – Coeficientes de regressão

C_{PEG} – Concentração de PEG

C_{SAL} – Concentração de SAL

K_p – Coeficiente de Partição da Proteína

K_e – Coeficiente de Partição da Atividade Enzimática

S – Seletividade

FP – Fator de Purificação

Y – Índice de Recuperação Teórica

Δ_tG – Energia Livre de Transferência de Gibbs

CEM – Cromatografia de Exclusão Molecular

Citrate-US – Extrato com citrato de sódio por Ultrassom

Acetate-US – Extrato com acetato de sódio por Ultrassom

Tris-US – Extrato com tris-HCL por Ultrassom

Citrate-AM – Extrato com citrato de sódio por agitação mecânica

Acetate-AM – Extrato com acetato de sódio por agitação mecânica

Tris-AM – Extrato com tris-HCL por agitação mecânica

EXT-FA – Extrato das Folhas da Alcachofra

SIST4FS – Sistema 4 Fase Superior

SIST4FI – Sistema 4 Fase Inferior

CAGR – Taxa de Crescimento Anual

LISTA DE SÍMBOLOS

Máx – Máximo

Min – Minutos

Seg – Segundos

kDa – Quilodaltons

® – Marca registrada

> – Maior

< – Menor

± – Mais ou menos

T – Temperatura

m – Massa

v – Volume

V – Volts

x g – Gravidade

°C – Graus Celsius

g – Gramas

% – Porcentagem

μL – Microlitro

nm – Nanômetro

μmol – micromol

mL – Mililitro

U – Unidades

mg – Miligrama

M – Molaridade

mm – Milímetros

cm⁻¹ – Centímetros a⁻¹

kJ – Quilojoules

R – Constante dos gases ideais

K – Kelvin

Z – Variável padronizada

X – Variável original

μ – Média populacional

σ – Desvio padrão

R^2 – Coeficiente de determinação

rpm – Rotação por minuto

kHz – Quilohertz

SILVA, G. M. **Obtenção de Proteases da Alcachofra (*Cynara scolymus* L.) e Purificação Parcial em Sistemas Aquosos Bifásicos.** Itapetinga – BA: UESB, 2023. 124p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.*

RESUMO

As proteases constituem um dos grupos mais importantes de enzimas para as aplicações industriais. Com o rápido crescimento no mercado, aumenta o interesse de pesquisas com fontes vegetais proteolíticas. Para utilização dessas proteínas são necessárias etapas de extração e purificação. Dentre diferentes métodos podemos citar os Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB's). São conhecidos por sua biocompatibilidade aprimorada e seletividade em processos de separação e purificação de biomoléculas. Nesse sentido, o objetivo desta pesquisa foi a obtenção de proteases a partir das folhas da alcachofra em diferentes tampões e condições, bem como, a purificação parcial por meio de SAB's. A metodologia utilizada foi baseada na extração com tampão citrato de sódio, acetato de sódio e tris-HCl, por agitação mecânica (AM) e ultrassom (US); e para verificar as melhores condições de extração foram determinados o teor de proteínas (DP), atividade proteolítica (AP), atividade específica (AE) e atividade de coagulação do leite (ACL). Posteriormente, com a melhor condição de extração foi realizado a purificação parcial utilizando SAB. Os SAB's foram formados por polietileno glicol (PEG) 1500 g.mol⁻¹ (10,5%, 14%, 17,5%), sal fosfato de sódio (9%, 12%, 15%), pH (6,0, 7,0, 8,0), água e extrato (com acetato em US), em temperatura a 25°C. Para verificar as melhores condições de purificação em SAB foi realizado um planejamento fatorial 2³ e análise de regressão múltipla, totalizando 9 experimentos; e verificadas as variáveis respostas, coeficiente de partição da atividade enzimática (K_e), fator de purificação (FP) e índice de recuperação teórica (Y). Afim de avaliar o perfil proteico do melhor resultado de partição em SAB foi realizado a análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O extrato com acetato de sódio em US apresentou destaque para os parâmetros DP (1,33), AP (13,04), AE (9,76), ACL (146,67) em relação à AM. Os extratos com o tampão citrato e acetato tiveram resultados satisfatórios para atuarem como coagulante vegetal. Os SAB's estudados mostraram que as proteases tiveram preferência pela fase rica em PEG, onde K_e>1. O sistema PEG 10,5%, sal 9% em pH 8 apresentou maiores valores para K_e (10,603), FP (0,437), Y (89,454%) dentre os sistemas avaliados. Os modelos matemáticos encontrados foram adequados para explicar as variáveis respostas, com elevados coeficientes de determinação (R²>0,90). Com a CLAE do sistema selecionado foi possível visualizar os picos predominantes na fase superior e inferior, com destaque no tempo de retenção 2,4 min (FS 36,6 mAU e FI 47,4 mAU). Conclui-se que, os extratos das folhas da alcachofra apresentaram enzimas proteolíticas e os SAB's avaliados podem ser utilizados como etapa alternativa para pré-purificação de proteases.

Palavras-chaves: Enzimas, proteases vegetais, extração líquido-líquido, partição.

* **Orientadora:** DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo, UESB.

SILVA, G. M. **Obtaining Proteases From Artichoke (*Cynara scolymus* L.) and Partial Purification in Aqueous Two-phase Systems.** Itapetinga – BA: UESB, 2023. 124p. Thesis (Doctorate in Engineering and Food Science), Area of Concentration: Food Engineering.

ABSTRACT

Proteases constitute one of the most important groups of enzymes for industrial applications. With the rapid growth in the market, increases the interest of research with plant sources proteolytic. To use these proteins, extraction and purification steps are necessary. Among different methods we can mention Aqueous Two-Phase Systems (ATPS). They are known for their improved biocompatibility and selectivity in biomolecule separation and purification processes. In this sense, the objective of this research was to obtain proteases from artichoke leaves in different buffers and conditions, as well as partial purification by means of ATPS. The methodology used was based on extraction with sodium citrate, sodium acetate and tris-HCl buffer, by mechanical stirring (MS) and ultrasound (US); and to verify the best extraction conditions were determined, protein content (PC), proteolytic activity (PA), specific activity (SA) and milk clotting activity (MCA). Subsequently, with the best extraction condition, partial purification was carried out using ATPS. The ATPS were formed by polyethylene glycol (PEG) 1500 g.mol⁻¹ (10.5%, 14%, 17.5%), sodium phosphate salt (9%, 12%, 15%), pH (6.0, 7.0, 8.0), water and extract (with acetate in US), at a temperature of 25°C. To verify the best purification conditions in ATPS, complete 2³ factorial design and multiple regression analysis were performed, totaling 9 experiments; and the response variables, partition coefficient of enzymatic activity (K_e), purification factor (FP) and theoretical recovery index (Y) were verified. In order to evaluate the protein profile of the best partition result in ATPS, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis was carried out. The extract with sodium acetate in US showed prominence for the parameters DP (1.33), PA (13.04), SA (9.76), MCA (146.67) in relation to MA. The extracts with the citrate and acetate buffer had satisfactory results to act as a vegetable coagulant. The ATPS studied showed that the proteases had a preference for the phase rich in PEG, where K_e>1. The PEG 10.5% system, salt 9% at pH 8 presented the highest values for K_e (10.603), FP (0.437), Y (89.454%) among the systems evaluated. The mathematical models found were adequate to explain the response variables, with high coefficients of determination (R²>0.90). With the HPLC of the selected system it was possible to visualize the predominant peaks in the upper and lower phases, with emphasis on the retention time of 2.4 min (FS 36.6 mAU and FI 47.4 mAU). It is concluded that the artichoke leaves extracts showed proteolytic enzymes and the ATPS evaluated can be used as an alternative step for proteases pre-purification.

Keywords: Enzymes, vegetable proteases, liquid-liquid extraction, partition.

* **Advisor:** DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo, UESB.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO
REFERÊNCIAL TEÓRICO
OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são conhecidas por apresentarem características importantes para atuarem como biocatalizadores em processos industriais e apresentam seletividade sob o substrato (EL-GENDI et al., 2022). A utilização de enzimas na indústria de alimentos e bebidas representa a maior parte da economia de países, consiste em 27.000 organizações e 1,5 milhões de pessoas trabalhando na área (MARKET INTELLIGENCE, 2021). As proteases correspondem ao principal grupo de enzimas de interesse industrial e são capazes de catalisar reações hidrolíticas, resultando na clivagem de proteínas em moléculas menores de peptídeos e aminoácidos (SUN et al., 2016; OLIVEIRA FILHO et al., 2022; ULLAH et al., 2022).

Mundialmente têm sido desenvolvidas pesquisas relacionadas à produção e investigação de biomoléculas proteolíticas para aplicações médicas, acadêmicas e industriais (OZTURKOGLU-BUDAK et al., 2016). Essas enzimas muitas vezes são (pré)purificadas e aplicadas na coagulação do leite, fabricação de queijos, produção de cervejas, hidrolisados proteicos, peptídeos bioativos, condicionamento de massas na indústria de panificação e modulação de sabores (HA et al., 2012; FERNÁNDEZ-LUCAS, CASTAÑEDA, HORMIGO, 2017; DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2018). O mercado de proteases evidencia um rápido crescimento (espera-se USD 3.32 Bilhões em 2023 e USD 4.45 bilhões em 2028) devido a elevada demanda na indústria de alimentos, com isso, há uma busca contínua por novas fontes de enzimas com características desejáveis para suprir esse setor (EL-GENDI et al., 2022; MORDOR INTELLIGENCE, 2023a e 2023c).

O campo de enzimas proteolíticas estudadas é constituído por fontes de origem animal (pepsina, renina, tripsina), vegetal (papaína, bromelina e ficina) e microbiológica (protease alcalina, ácida e neutra), e as outras proteases (SANTOS et al., 2016; MORDOR INTELLIGENCE, 2023b). Devido a questões culturais, éticas, religiosas e/ou mudanças alimentares, enzimas extraídas de fontes animal e de microrganismos tornam-se limitadas por grupos específicos e não atendem à crescente demanda mundial (AFSHARNEZHAD, SHAHANGIAN, SARIRI, 2019). Dessa forma, proteases vegetais são utilizadas como alternativas, em virtude da diversidade ao tipo e meio de extração, e da ampla variedade de fontes botânicas no Brasil e mundo, por exemplo de resíduos agroindustriais, oferecendo benefícios do ponto de vista econômico, ecológico e tecnológico (MAZORRA-MANZANO et al., 2013).

Extratos e proteases purificadas de fontes vegetais têm sido avaliadas, como em frutas (kiwi, melão e mamão), raízes (rizoma de gengibre), látex (mamão e macieira), flores (alcachofra, cardo de espécies diferentes como *Cynara cardunculus*, *Centaurea calcitrapa*, *Cynara humilis*, *Carlina acanthifolia*); caules de *Dregea sinensis*; folhas da ora-pro-nobis, de *kesinai*, e *Moringa oleífera* (MAZORRA-MANZANO et al., 2013; LLORENTE et al., 2014; NADAR, PAWAR, RATHOD, 2017; BANIK, BISWAS, KARMAKAR, 2018; BUENO-GAVILÁ et al., 2020; ZHAO et al., 2021; ALVES et al., 2022; NICOSIA et al., 2022). Muitas dessas fontes proteolíticas foram recomendadas para coagulação do leite e caracterizadas para a produção de queijos.

À vista disso, dentre as plantas que contêm presença de proteases está a alcachofra (*Cynara scolymus* L.). É uma planta exótica e comestível, saboreada e estudada em diversos países (MAZZEO et al., 2020) e que vem conquistando também os brasileiros. No entanto, a parte mais caracterizada são as enzimas extraídas das flores da alcachofra, e as demais partes como, as folhas, brácteas e caules são limitadas (ESPOSITO et al., 2016). Nesta pesquisa, o intuito foi trabalhar com as folhas da alcachofra como possível fonte de atividade proteolítica, para atribuir valor agregado ao vegetal e explorar suas peculiaridades. Geralmente, o extrato bruto de proteases é adicionado sem nenhum tratamento a determinado produto, podendo afetar negativamente a sua uniformidade, devido a fonte utilizada ser de condições variadas (período do ano, cultivo, variedade), bem como, das técnicas de extração utilizadas (SAMPAIO et al., 2019).

Para minimizar tais problemas tem-se a necessidade da purificação de enzimas. A bioseparação é uma parte importante e fundamental na biotecnologia, com isso, há um crescente interesse para o desenvolvimento de técnicas alternativas de extração e purificação de materiais biologicamente ativos. Os sistemas bifásicos aquosos (SAB) têm sido reconhecidos como uma estratégia de processamento “downstream” (purificação) ideal, acessível, suave e útil para separação e purificação de uma ampla gama de moléculas de importância biotecnológica (ácidos nucleicos, enzimas, proteínas e organelas) (JAMEHBOZORG, SADEGHI, 2019), além do número reduzido de etapas, custo mais baixo, atoxicidade e potencial para aplicações em larga escala (OLIVEIRA et al., 2018). Os compostos envolvidos nesse sistema podem ser polímeros, tais como polietileno glicol e Dextrana, e sais inorgânicos como fosfatos, citratos e sulfatos, entre outros.

Diante disso, o objetivo desta pesquisa foi obter proteases a partir das folhas da alcachofra em diferentes condições de extração e analisar a utilização de Sistemas Aquosos

Bifásicos (SAB's) formados por polietileno glicol 1500 g.mol⁻¹, sal fosfato de sódio e água para purificação parcial desta enzima.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Enzimas

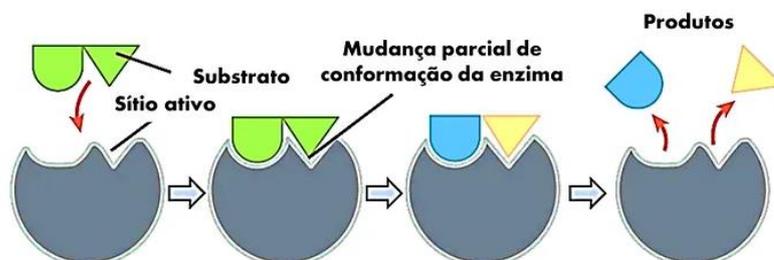
No período entre os séculos XVII e XIX, a ação das enzimas em tecidos vivos ou que respiram era referida como fermento. Nos primórdios da enzimologia têm-se como exemplos de processos enzimáticos a fermentação alcoólica de leveduras, processos digestivos em animais e malteamento de grãos. A partir do termo grego “enzyme”, que significa “na levedura” foi criado o termo “enzima”, por Wilhelm Friedrich Kuhne, em 1878. As enzimas de alimentos podem ser classificadas em fontes exógenas (adicionadas aos alimentos para causar mudança desejável) e fontes endógenas (existem nos alimentos, podem ou não ser responsáveis por reações que afetam sua qualidade) (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2018).

As enzimas têm estrutura molecular complexa, formada por heteropolímeros (união de monômeros diferentes), particularmente as proteínas e outras moléculas podem estar interligadas, como os carboidratos e lipídios (HARTMEIER, 1988). A estrutura primária das enzimas refere-se à sequência de aminoácidos ligados; a estrutura secundária representa à interação desses aminoácidos com aminoácidos adjacentes, gerando arranjos espaciais do tipo α -hélice ou folha- β ; a estrutura terciária está relacionada com as interações entre os aminoácidos que não têm proximidade sequencial, ocasionando torções e dobramentos. Essa estrutura representa o sítio catalítico da enzima, sendo determinante para sua atividade biológica; a estrutura quaternária das enzimas corresponde à interação entre cadeias polipeptídicas (MARQUES, 2014).

A função das proteínas depende em parte da aquisição de estruturas tridimensionais específicas por dobramento em escalas de tempo fisiológicas. As células manifestam mecanismos altamente controlados para manter o dobramento de proteínas nativas, que incluem padrões de estrutura tridimensional detalhados e domínios desordenados específicos. Apesar do processo ser eficiente, o mecanismo pode falhar e se deparar com a proteína dobrada em um estado não nativo. Diante disso, a estabilidade estrutural das proteínas depende em parte dos resíduos hidrofóbicos orientados para o núcleo da proteína (DÍAZ-VILLANUEVA, DÍAZ-MOLINA, GARCÍA-GONZÁLEZ, 2015).

As enzimas são totalmente seletivas, possuem alto grau de especificidade da reação para os seus respectivos substratos e apresentam catalisadores eficientes, geralmente maior que os catalisadores sintéticos e inorgânicos (ARANTES, 2008; SAYALI, SADICHHA, SUREKHA, 2013). A hipótese conhecida como “chave e fechadura” (Figura 1) relatada por

Fischer explica o poder catalítico das enzimas. Essa proposta foi complementada por Haldane, que mencionou que o substrato não “encaixa” diretamente na enzima e sofre uma distorção após a formação do complexo enzima-substrato, como também pela proposta de Pauling, de que a enzima é estabilizada no sítio ativo enzimático (ARANTES, 2008).



Fonte: Ramalho et al. (2021).

Figura 1. O esquema ilustra a interação entre a enzima e substrato para formação do produto.

A natureza fornece um conjunto diversificado de enzimas com capacidade de catalisar uma reação específica. Para as enzimas exercerem essa atividade apresentam diversas complexidades estruturais conhecidas como as relações estrutura-função, na qual estão associadas ao mecanismo catalítico e às características estruturais que tornam a reação realizável (KINGSLEY, LILL, 2015). A catálise das reações ocorre no subconjunto de resíduos encontrados no sítio ativo das enzimas, especificidades do substrato e eficiência catalítica. O sítio ativo das enzimas é a região em que os substratos obtidos são quimicamente convertidos em produtos (WILDERMAN et al., 2012; KINGSLEY, LILL, 2015). Já o termo mecanismo catalítico é empregado para especificar as interações ou forças microscópicas usadas pelas enzimas para aumentar a velocidade de reações, e o termo mecanismo de reação é a sequência de transformações, ou seja, quebra e formação de ligações químicas, e modificações da estrutura do complexo enzimático conferidas a partir da reação em progresso (ARANTES, 2008).

O mercado global de enzimas foi estimado em US\$ 6,4 bilhões em 2021, apresentando uma taxa de crescimento anual de 6,3% e pode atingir US\$ 8,7 bilhões até 2026 (BCC, 2022). O mercado é segmentado pelas indústrias de alimentos e bebidas, ração animal, saúde, têxteis, processamento de couro, produtos de limpeza, biocombustíveis e outras aplicações (MODOR INTELLIGENCE, 2023a). O crescimento do mercado de enzimas está relacionado aos avanços na engenharia e tecnologia, que permitem a obtenção de enzimas mais eficientes, como também, à especificidade da enzima em relação ao

substrato, à importância do produto gerado e à demanda do mercado consumidor (NOVOZYMES, 2020).

2.2. Enzimas Proteolíticas

Dentre as enzimas utilizadas temos as proteases. São enzimas que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas levando a formação de grupos amina e carboxila (SUN et al., 2016; DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2018). As proteases são conhecidas como peptidases, proteinases, peptídeo hidrolases e enzimas proteolíticas. A ampla distribuição de proteases entre plantas, animais e microrganismos demonstram que elas são necessárias para organismos vivos, e desempenha importantes papéis fisiológicos em processos biológicos bastante diversos (GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011). As proteases são algumas das enzimas mais bem caracterizadas em reconhecimento a seu papel vital no sistema digestivo humano (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2018).

Segundo o Comitê Internacional de Enzimas (*Enzyme Commission*) as proteases são enzimas que pertencem à classe das hidrolases (3) e subclasse das peptídeo-hidrolases ou peptidases (4), podendo ser conhecidas como EC 3.4. Também podem ser classificadas pelo tipo de reação catalisada, natureza química do sítio catalítico e conformidade com a estrutura (PALMA et al., 2002). As proteases podem atuar perto das extremidades das cadeias polipeptídicas (exopeptidases) ou dentro delas (endopeptidases). As exopeptidases são diferenciadas de acordo com a sua especificidade de substrato como aminopeptidases, que são capazes de clivar as ligações peptídicas no grupo terminal-N, e carboxipeptidases que degradam peptídeos no terminal-C do substrato. As endopeptidases possuem preferência pela quebra de ligações internas à cadeia polipeptídica. São classificadas conforme seu mecanismo catalítico, o que implica especificidade no sítio ativo da enzima, bem como nos mecanismos de clivagem caracterizado em cada grupo (SIRITAPETAWEE et al., 2012; HSIAO et al., 2014; GURUMALLESH et al., 2019).

O banco de dados MEROPS, recurso de informação para peptidases, considera sete famílias de proteases de acordo com os aminoácidos que compõem seu sítio ativo: aspártica (EC 3.4.23), cisteína (EC 3.4.22), glutâmico, metaloprotease (EC 3.4.24), asparagina (EC 3.4.23), serina (EC 3.4.21) e treonina (EC 3.4.25) (RAWLINGS, BARRETT, BATEMAN, 2010; LI et al., 2013; HSIAO et al., 2014).

As proteases de cisteínas são largamente distribuídas entre os organismos vivos, encontradas tanto em procariotas como eucariotas, por exemplo, bactérias, parasitas, plantas,

invertebrados e vertebrados (GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011). As proteases do tipo cisteína possuem resíduos CYS e HIS em seu sítio catalítico e compreendem mais de 130 famílias diferentes. As enzimas desse grupo apresentam massa de 24 – 35 kDa, tem atividade ótima em pH 6,0 – 7,5 e podem suportar temperaturas de até 60-80 °C (FAHEEM et al., 2016; DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2018).

As proteases serinas são encontradas em procariontes e eucariontes. Entre as enzimas proteolíticas estudadas inicialmente encontram-se as serinas secretadas pelo pâncreas, a tripsina, a quimotripsina e a elastase, já que estão envolvidas na digestão humana e na assimilação de nutrientes. Também estão presentes em muitos tecidos vegetais, mais abundantemente em frutos e foi relatada estabilidade em uma ampla faixa de pH (4,0 – 11,0), bem como uma ampla faixa de temperatura (20 – 90 °C). A maioria dos membros desse grupo apresentam massas moleculares de 25 – 35 kDa (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2018; NICOSIA et al., 2022). Estas enzimas envolvem um resíduo de SER em seu sítio ativo e compartilham uma série de características bioquímicas e fisiológicas e estão agrupadas em mais de 20 famílias (GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011).

Em comparação com outros tipos de proteases, existe pouco conhecimento até o momento sobre as metaloproteases e mais de 50 famílias foram identificadas. Em termos de estrutura e função as metaloproteases são as mais diversas (SCHALLER, 2004; NICOSIA et al., 2022).

As proteases aspárticas são amplamente distribuídas na natureza entre os animais, plantas, leveduras, bactérias, parasitas, fungos e vírus. Essas enzimas são caracterizadas pela presença de dois resíduos de ácido aspárticos responsáveis pela atividade catalítica dos substratos peptídicos, são mais ativas em condições ácidas (pH 1 – 6), com ponto ótimo próximo de pH 3 – 5 (MANDUJANO-GONZÁLEZ et al., 2016; DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2018). Além disso, as proteases aspárticas têm preferência por clivagem entre aminoácidos hidrofóbicos ácidos e são sensíveis à pepstatina A (LUFRANO et al., 2012).

Membros familiares desse grupo incluem a enzima digestiva pepsina, a quimosina (também chamada “renina” ou “coalho”, usada na produção de queijos), a catepsina e as peptidases substitutas da quimosina. A maioria das proteases aspárticas consiste em enzimas de cadeia simples com massa molar de 34 – 40 kDa (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2018) e sua estrutura quase inteiramente em folha β e minimamente em α -hélice (NICOSIA et al., 2022). A cardosina A e a cardosina B são glicoproteínas compostas por uma cadeia de 31 e 34 kDa e outra cadeia de 14 e 15 kDa. A cardosina A e B são frequentemente comparadas à quimosina e pepsina, respectivamente, pois a cardosina B é

menos seletiva que A na hidrólise de caseínas (ALMEIDA, SIMÕES, 2018). Verissimo et al. (1995) e Verissimo et al. (1996) identificaram proteinases aspárticas em flores de *Cynara cardunculus L.* e picos de cadeias polipeptídicas constituintes de cardosinas A e B.

2.2.1. Fontes de obtenção de enzimas proteolíticas

As proteases são as enzimas mais empregadas em síntese orgânica e podem ser obtidas a partir de diversas fontes, como de animais, microrganismos e vegetais, sendo que as suas propriedades variam de acordo com a fonte de obtenção. A maior parte das enzimas proteolíticas utilizadas em processos industriais tem sido obtida principalmente a partir de fontes microbianas (FEIJOO-SIOTA, VILLA, 2011; BAH et al., 2015; CHÁVEZ-GARAY et al., 2016). Devido a pesquisas sobre a extração, purificação e aplicação de enzimas proteolíticas a partir de diferentes fontes, é necessário o conhecimento prévio das suas desvantagens e vantagens com intuito de buscar melhores opções para a realidade dos pesquisadores, do meio e a finalidade do estudo.

Algumas das desvantagens de cada fonte estão descritas a seguir. A produção de proteases originárias de animais depende geralmente da disponibilidade do animal para o abate, sendo um processo com despesas elevadas e realizadas em grandes quantidades, envolve várias etapas e operações, tornando o fornecimento da enzima muito trabalhoso (PUGLISI, PETRONE, LO PIERO, 2014; BEY et al., 2018). Além disso, há restrições dos consumidores vegetarianos e veganos por esse tipo de produto. As principais proteases de origem animal são extraídas de tecidos específicos, como estômago de ruminantes, sendo retiradas a renina e a pepsina; do estômago de bezerros, obtendo a quimosina; de tecido pancreático de bovinos e suínos, extraídas a tripsina pancreática e a quimotripsina (RAO et al., 1998; JACOB et al., 2011; PUGLISI, PETRONE, LO PIERO, 2014).

As enzimas de fonte microbiana produzidas por fermentação em estado sólido possuem desvantagens por ser difícil o controle dos parâmetros do processo, geralmente mais lento devido à barreira de difusão, dificuldades no aumento de escala e sem concentração definida dos componentes do meio (DORIYA et al., 2016; SHARMA et al., 2017; CONTESINI, MELO, SATO, 2018). Na fermentação submersa os produtos são diluídos e menos estáveis, requer alto teor de umidade, alta necessidade de energia, custo elevado, alta liberação de efluentes (DORIYA et al., 2016; CONTESINI, MELO, SATO, 2018). Os métodos de engenharia genética como a evolução dirigida e a mutagênese de saturação tem baixa eficiência e sua biblioteca de mutações aleatórias é grande (YANG et al., 2013). Bactérias geneticamente modificadas provou ser um substituto adequado da

quimosina do coalho animal (AHMED et al., 2009). No entanto, as limitações por parte da população por alimentos geneticamente modificados, as questões religiosas (por exemplo, judaísmo e islamismo) e mudanças nos hábitos alimentares levaram a um crescente interesse por fontes vegetais (PUGLISI, PETRONE, LO PIERO, 2014).

As enzimas obtidas por animais apresentam vantagens por serem consolidadas no mercado e apresentarem alta eficiência nas aplicações industriais, como por exemplo na utilização da quimosina (coalho animal) para produção de queijos (ALMEIDA et al., 2015). As vantagens das biomoléculas obtidas a partir de microrganismos são: crescimento acelerado e diversidade bioquímica (ROSSO et al., 2012), produção independente de fatores sazonais, obtenção por processos simples, possibilidade da utilização de substratos baratos como os resíduos agrícolas, probabilidade de boa rentabilidade a partir da otimização das condições (SAID, PIETRO, 2002).

As proteases de origem vegetal dependem de alguns fatores para sua obtenção, como a disponibilidade de cultivo das plantas, as boas condições climáticas para o seu crescimento e o período de colheita adequado. As principais proteases vegetais são a papaína extraída do látex do mamão verde, a bromelina presente no abacaxi e a ficina retirada do látex do figo verde (GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011; PAVAN et al., 2012; SUN et al., 2016).

A busca por proteases provenientes de vegetais aumenta gradativamente devido as suas vantagens como, variedade de fontes botânicas, alta estabilidade em condições adversas, atividade em ampla faixa de pH e temperatura, boa solubilidade e especificidade do substrato, e baixo custo de produção (FEIJOO-SIOTA, VILLA, 2011; AMID et al., 2012; ARAVIND et al., 2013), e por suprir as desvantagens das demais fontes citadas anteriormente. No Brasil há uma grande variedade de plantas cultivadas que podem constituir fontes inesgotáveis de enzimas para serem aplicados nas mais diversas áreas do conhecimento. Para utilização das enzimas de fontes vegetais é necessário a extração para posterior purificação.

2.2.2. Extração de proteases de fontes vegetais

Levando em consideração o desenvolvimento sustentável e a utilização de recursos biológicos, os subprodutos gerados no processamento vegetal representam um grande potencial para extração de peptídeos (WEN et al., 2020). Proteases são requeridas pelas plantas em todos os aspectos do seu ciclo de vida. Estas enzimas estão presentes uniformemente nos tecidos das plantas, assumindo várias funções desde a germinação até os processos de senescência (SCHALLER 2004; SHAH, MIR, PARAY, 2014).

Enzimas proteolíticas já foram identificadas em diversas fontes não convencionais de vegetais do tipo aspártica, cisteína e serina, conforme demonstrado no Quadro 1. Verifica-se nas pesquisas tipos de soluções e métodos utilizados para obtenção de proteases, como também os autores e respectivos países na qual desenvolveram tais pesquisas.

Quadro 1. Fontes e classificação de proteases vegetais, forma de extração, e autores de diferentes lugares do mundo.

Fonte, nome científico	Classificação	Tipo de solução e método	Autor	País
Casca de mamão (<i>Carica papaya</i>)	Cisteína	Solução água e tampão fosfato (pH 7,0) e amostras trituradas em um liquidificador.	CHAIWUT, RAWDKUEN, BENJAKUL (2010)	Tailândia
Folhas de Kesinai (<i>Streblu asper</i>)	Serina	Extração enzimática, água destilada e fosfato de hidrogênio, pH 7,5 em um misturador comercial.	MEHRNOU, MUSTAFA, YAZID (2011)	Malásia
Folha da jaca (<i>Artocarpus heterophyllus</i>)	Serina	Tampão fosfato de sódio pH 7,0 sob agitação.	BALQIS, ROSMA (2011)	Malásia
Casca da manga (<i>Mangifera indica</i> cv Chokanan)	Serina	Tampão fosfato de sódio pH 7,5 usando um misturador comercial.	MEHRNOUSH et al. (2012)	Malásia

Flores da laranja azeda (<i>Citrus aurantium</i> L.)	Aspártica	Tampão Tris HCl, pH 7,2 em um liquidificador em velocidade máxima.	MAZORRA-MANZANO et al. (2013)	México
Flores do cardo (<i>Cynara Cardunculus</i>)	Aspártica	Água ultrapura e agitação mecânica.	ORDIALES et al. (2014)	Espanha
Jiló (<i>Solanum aethiopicum</i> Shum)	-	Imersão em água destilada maceradas em meias de extração citrato de sódio pH 4 e 5, fosfato de sódio e fosfato monopotássico.	GUIAMA et al. (2014)	Camarões
Latex da fruta pão (<i>Artocarpus altilis</i>)	-	Tampão fosfato pH 7,0 sob agitação.	SOARES et al. (2015)	Brasil
Alcachofra (<i>Cynara scolymus</i>) e Cardo Alpino (<i>Carduus defloratus</i>)	Aspártica	Tampão citrato de sódio pH 3,0, acetato de sódio pH 5,0 e Tris-HCl pH 7,0 e homogeneizado em incubadora orbital.	ESPOSITO et al. (2016)	Itália

<p>Kiwis (<i>Actinidia deliciosa</i> Planch); Abacaxi (<i>Ananas comosus</i> Linn. Merr); Pitaya (<i>Hylocereus undulatus</i> Britt); Jaca (<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam), (Moraceae); Romã (<i>Punica granatum</i> Linn) (Punicaceae); Pêssego (<i>Amygdalus persica</i> Linn), (Rosaceae); Damasco (<i>Armeniaca vulgaris</i> Lam); Laranja (<i>Citrus junos</i> Sieb . ex Tanaka), (Rutaceae); Limão (<i>Citrus limon</i> Linn. Burm. F); Abacate (<i>Butyrospermum parkii</i> Kotschy).</p>	<p>-</p>	<p>Tampão fosfato pH 7,0 e homogeneizado.</p>	<p>SUN et al. (2016)</p>	<p>China</p>
--	----------	---	--------------------------	--------------

Grãos de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	-	A farinha de girassol foi mantida sob agitador com hidróxido de sódio pH 6,5.	CAMPBELL et al. (2016)	França
Polpa e casca de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	-	Homogeneizado em tampão fosfato de potássio pH 7,8.	MEHDI et al. (2017)	Iraque e Malásia
Folhas maduras de moringa (<i>Moringa oleífera</i>)	Aspártica	Trituradas com tampão fosfato pH 7,5.	BANIK, BISWAS, KARMAKAR (2018)	Índia
Caules e folhas de erva doce (<i>Foeniculum vulgare</i>)	-	Maceração aquosa com água destilada.	BEY et al. (2018)	Tunísia
Folhas maxixe-bravo (<i>Cucumis dipsaceus</i>)	Serina	Agitador rotativo, precipitação com 80% de sulfato de amônio.	MADHU, SHARADA (2019)	Índia
Frutos da figueira (<i>Ficus johannis</i> Boiss)	Cisteína	Tampão fosfato de sódio pH 7,0, em liquidificador. Após, agitação contínua por 60 min a 4 °C.	AFSHARNEZ HAD, SHAHANGIA, SARIRI (2019)	Irã

Flores da alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.)	Aspártica	Material macerado em água destilada.	BUENO-GAVILÁ et al. (2020)	Espanha
Sementes de Canola (<i>Brassica napus</i>)	-	Moedor mecânico e genótipo dissolvido em tampão de extração cloreto de e Tris-HCl em pH 8,1.	HUSSAIN et al. (2021)	Austrália

(-) Não especificado.

Outros estudos também foram realizados com extração de proteases aspárticas de fontes vegetais, como cardo (*Cynara cardunculus*) (ORDIALES et al., 2014; ZIKIOU et al., 2020), Acanto-bastardo (*Onopordum acanthium*) (BRUTTI et al., 2012), urtiga-de-boi (*Solanum elaeagnifolium*) (NÉSTOR, DELY RUBÍ, HÉCTOR, 2012), cardo-roxo (*Cirsium vulgare*) (LUFRAÑO et al., 2012); proteases de cisteína como kiwi (*Actinidia chinensis*) (KATSAROS, TAVANTZIS, TAOUKIS, 2010), Bromelaina (*Ananas comosus*), papaína (*Carica papaya*) (ABADÍA-GARCÍA et al., 2016), flor do pão (*Vallisneria spiralis*) (SOMAVARAPU, VEMULA, REDDY, 2018); proteases serina como arbusto (*Euphorbia neriiifolia*) (YADAV, PATEL, JAGANNADHAM, 2012), pitaia (*Hylocereus polyrhizus*) (AMID, MANAP, ZOHD, 2014), maxixe-bravo (*Cucumis dipsaceus*) (MADHU, SHARADA, 2019), chá-da-índia (*Camellia sinensis*) (CHEN et al., 2016), figueira-dos-pagodes-B (*Ficus religiosa*) (KUMARI, SHARMA, JAGANNADHAM, 2012), Jaca (*Artocarpus heterophyllus*) (SIRITAPETAWE et al. 2012), morango (*Fragaria ananassa*) (ALICI, ARABACI, 2018).

Para extração de enzimas vegetais podem ser utilizados métodos físicos como de agitação mecânica e ultrassom, e métodos químicos, por meio de soluções diferenciadas, como por exemplo tampão fosfato de sódio, fosfato de potássio, citrato de sódio, Tris-HCl, acetato de sódio, entre outros, em diferentes pH. Estas opções geralmente são selecionadas através de pesquisas na literatura e análises realizadas em laboratórios com diferentes maneiras para encontrar o propósito do trabalho. Os métodos podem ser utilizados em conjunto com intuito de obter as melhores respostas.

Os métodos físicos são realizados com técnicas que acarretam na ruptura dos tecidos vegetais, desde a agitação mecânica à utilização de ultrassom. Na agitação mecânica é utilizado um homogeneizador com pistão para ser inserido nos tubos das amostras com intuito de romper a membrana, por meio de trituração, mistura ou cisalhamento. Podem ser realizadas em temperatura ambiente ou refrigerada (LIMA e SANTANA, 2017).

A extração por ultrassom é um método que utiliza principalmente o efeito mecânico do ultrassom e da cavitação (origina na criação ou aumento de bolhas no meio) para degradação de partículas da parede celular do vegetal, intensificando a entrada do solvente intracelular e assim, aumentando a eficiência da transferência de massa (LIN et al., 2023) causando maior extração. Além disso, alguns benefícios podem enfatizar o uso deste método, como baixo consumo de energia, menor tempo de tratamento, menor uso de solventes, maior segurança dos operadores, maior rendimento e em termos ambientais é uma tecnologia não térmica (CHEMAT et al., 2017). O método de extração também pode se basear na utilização de diferentes solventes. Nesse caso, fatores como tipo de tampão e sua concentração, temperatura e tempo de extração variam com o objetivo de aumentar a eficiência do processo.

2.2.3. Aplicação de enzimas proteolíticas vegetais em alimentos

As enzimas proteolíticas são o grupo de enzimas de maior importância industrial e respondem por mais de 65% das enzimas comercializadas internacionalmente. São utilizadas principalmente nas indústrias de detergentes, farmacêutica, biotecnológica e de alimentos (OZTURKOGLU-BUDAK et al., 2016). Estima-se que o mercado global de protease cresça a uma CAGR (taxa de crescimento anual) de 5,8% durante o período de previsão (2020 - 2025) (MORDOR INTELLIGENCE, 2023b).

As proteases vegetais são objeto de atenção das indústrias, não apenas por sua atividade proteolítica em uma ampla variedade de proteínas, como também, por suas vantagens ativas em diferentes processos industriais. Com isso, estimula a realização de pesquisas sobre proteases de origem vegetais. O desenvolvimento biotecnológico e, em particular, a engenharia preveem o surgimento destas proteases com mais e melhores propriedades industriais (FEIJOO-SIOTA, VILLA, 2011; INACIO et al., 2015; ALI et al., 2016; RAZZAQ et al., 2019). É restrito o número de proteases de origem vegetal utilizadas industrialmente (SUN et al., 2016). As enzimas proteolíticas têm aplicações no processamento de alimentos, incluindo coagulação do leite, panificação, cervejaria,

amolecimento da carne e hidrolisados proteicos (MAHAJAN, BADGUJAR, 2010; FEIJOO-SIOTA, VILLA, 2011; HA et al., 2012).

A maioria das proteases usadas como coagulantes do leite pertence às proteases aspárticas, mas também foi relatado que proteases de outros tipos, tais como proteases de cisteína e serina, mostram a capacidade de coagular o leite sob condições adequadas (SUN et al., 2016). A quimosina (renina) e seus substitutos são adicionados ao leite para causar reação inicial de coagulação na manufatura de queijos. Culturas são adicionadas ao leite a 40-45 °C para influenciar na redução do pH para 5,8 - 6,5. Logo, parte da atividade enzimática permanece no coágulo e contribui para a maturação do queijo e o desenvolvimento de sabor durante a maturação (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2018).

Cada vez mais estudos estão voltados para coagulantes de extratos brutos ou enzimas purificadas de origem vegetal, como por exemplo nas flores da alcachofra (BUENO-GAVILÁ et al., 2020), do cardo (ZIKIOU et al., 2020), e laranja (MAZORRA-MANZANO et al., 2013). Essas enzimas encontradas em tecidos vegetais podem hidrolisar caseínas do leite em diferentes pH e temperaturas, apresentam especificidades e características diferentes no produto final. Queijos feitos com coagulante vegetal podem ser encontrados principalmente nos países do Mediterrâneo, da África Ocidental e do sul da Europa (SHAH, MIR, PARAY, 2014).

Para utilização dessas proteases em formulações de massas, além do tipo de farinha a adição de proteases auxiliam nos aspectos de força e propriedades reológicas da massa, provocando impacto sobre a qualidade final do produto. As proteases são utilizadas para modificar e otimizar a força da massa para um produto em particular, servindo para reduzir o tempo de mistura a fim de que se obtenha a viscoelasticidade adequada da massa, podem também melhorar o desempenho de farinha com glúten danificado (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2018). São usados na indústria cervejeira para obter boas propriedades coloidais em baixas temperaturas, eliminando assim a turvação, causada pela associação de taninos e proteínas. A enzima papaína tem sido utilizada para hidrolisar proteínas e minimizar esse fator negativo, a bromelina e a ficina podem ser usadas com a mesma finalidade (JONES, 2005; DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2018).

Embora as proteases derivadas de plantas sejam utilizadas nas indústrias, observa-se poucos estudos sobre o potencial de produção de proteases de várias frutas e vegetais (GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011; SHAH, MIR, PARAY, 2014). A fim de desenvolver novas proteases a partir de recursos vegetais, a distribuição de proteases entre várias espécies

de plantas deve ser detectada e estudada (SUN et al., 2016). Em uma planta, as folhas, brácteas e talos com exceção das raízes, contêm quantidades significantes da enzima, que podem ser extraídas como suco prensado e posteriormente purificadas. Dentre as plantas podemos citar a alcachofra.

2.3. Alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*)

2.3.1. Divisão, colheita e produção da alcachofra

A alcachofra [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori] (Figura 2) é uma planta herbácea perene, nativa da bacia do Mediterrâneo, pertencente à família Asteraceae. A parte comestível da planta é o capítulo de inflorescência imaturo, geralmente chamado de cabeça, livres e dispostas em várias fileiras, protegido por um involúcro de muitas brácteas espessas e macias, utilizado em todo o mundo na alimentação como iguarias frescas, enlatadas ou congelados (IERNA, MAURO, MAUROMICALE, 2012; FALCO et al., 2015; MAZZEO et al., 2020). As partes internas macias constituem quase 35 a 55% do peso fresco da cabeça, dependendo da variedade e do tempo de colheita (LATTANZIO et al., 2009). As cabeças (flores) são hermafroditas, tubulares, protândricas e azul-violeta (MAZZEO et al., 2020). Os caules e folhas correspondem a maior parte da alcachofra e são os subprodutos mais abundantes do processamento industrial (LATTANZIO et al., 2009; CONIDI, CASSANO, GARCIA-CASTELLO, 2014).

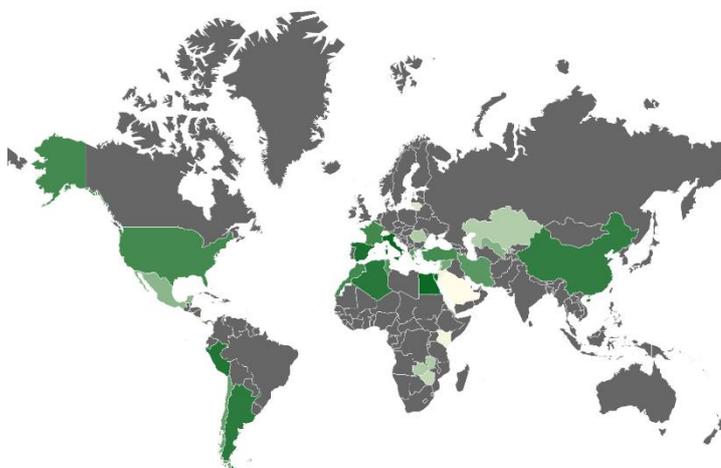


Fonte: Autora.

Figura 2. Partes da alcachofra (*Cynara scolomys*).

Cerca de 80% da área colhida de alcachofra do mundo está localizada nos países do Mediterrâneo, embora com uma tendência decrescente (PESCE, MAUROMICALE, 2019). A produção de alcachofra (Figura 3) é amplamente difundida em todo o mundo (123.019 ha) e principalmente na Europa (Itália 378.820t, Grécia 15.130t, Espanha 199.940t, França 38.030t), norte da África (Egito 296.899t, Marrocos 44.774t, Argélia 119.636t, Tunísia 28.000t), Oriente Médio (Turquia 39.071t, Irã 19.451t), América do Sul (Peru 131.882t, Argentina 111.853t, Chile 10.926t), América do Norte (Estados Unidos 45.722t) e Ásia (China 92.907t) (FAOSTAT, 2022).

No Brasil a cultura da alcachofra ainda não tem expressão e pesquisas sobre esta espécie são menos encontradas. A produção de alcachofra no Brasil se concentra em São Paulo e representa fonte significativa de renda para os produtores, porém não existem dados de produção em tonelada (DIDONÉ et al., 2015; FAOSTAT, 2022). Destacam-se na região fria de São Paulo, onde se localizam as cidades de Piedade, Ibiúna, São Roque e Capão Bonito, e no Rio de Janeiro na sua região serrana, onde se localizam as cidades de Petrópolis e Teresópolis (ULLMANN, 2022).



Fonte: FAOSTAT (2022).

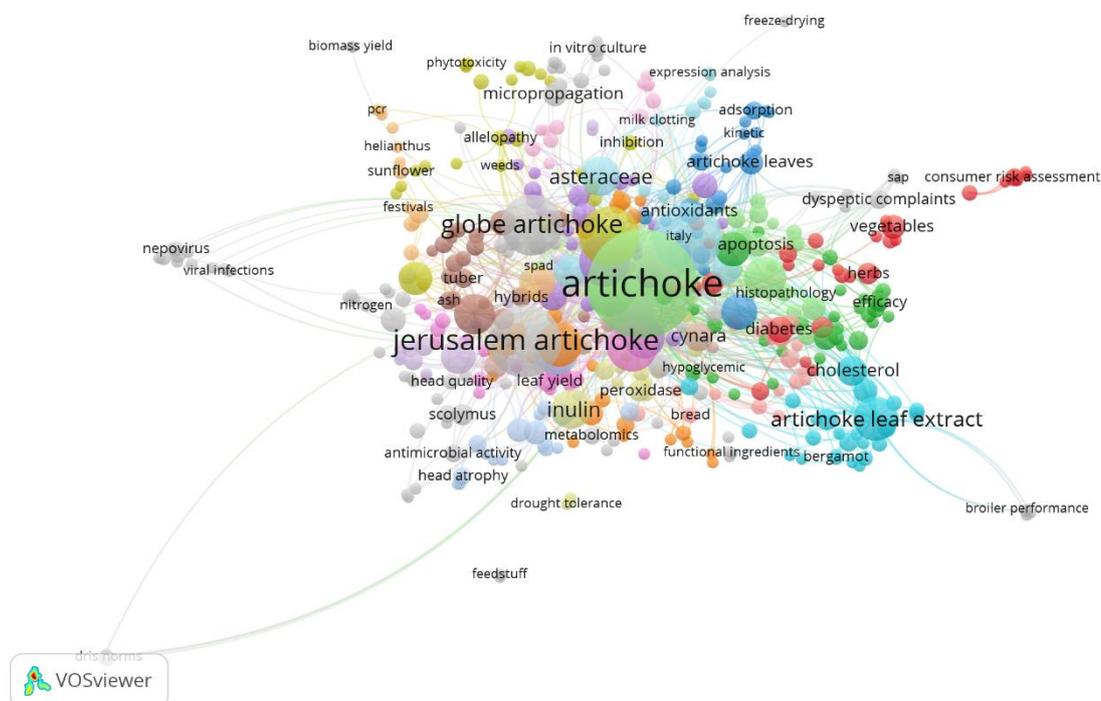
Figura 3. Produção da alcachofra no mundo.

2.3.2. Valores nutricionais e medicinais da alcachofra

A alcachofra é uma planta exótica e comestível, saboreada em diversos países e que vem conquistando também os brasileiros. É considerada um vegetal essencial na dieta mediterrânea desde os tempos antigos devido ao seu alto teor de proteínas, minerais e fibras alimentares (LUTZ, HENRÍQUEZ, ESCOBAR, 2011; MARTÍNEZ-ESPLÁ et al., 2017).

Além do valor nutritivo da alcachofra, é bem reconhecida em estudos por seus efeitos benéficos medicinais como coleréticos, diuréticos, hipocolesterolêmicos, anticarcinogênicos, tratamento de doenças do fígado, antioxidante, anti-inflamatórias e antimicrobianas (LATTANZIO et al., 2009; FALCO et al., 2015; ELSEBAI et al., 2016; MARTÍNEZ-ESPLÁ et al., 2017).

As frações comestíveis e os subprodutos (folhas, brácteas e caules externos) da alcachofra são fontes bem conhecidas de fibras alimentares e polifenóis (LATTANZIO et al., 2009, PANDINO et al., 2010). As folhas da alcachofra também são tradicionalmente usadas como fitoterápicos por seus efeitos benéficos e terapêuticos (LATTANZIO et al., 2009; BORGOGNONE et al., 2014). A maioria dos trabalhos (Figura 4) encontrados na literatura sobre a alcachofra estão voltados para área medicinal.



Fonte: Autora.

Figura 4. Gráfico de rede com palavras-chaves verificadas na base de dados Scopus.

A alcachofra é um produto muito perecível e se deteriora rapidamente após a colheita, devido à sua alta taxa de respiração, perda de peso, e outros danos fisiológicos e mecânicos. O processamento das alcachofras como um produto recém-cortado exige operações de lavagem, e corte que aumentam a taxa de respiração, aceleram a senescência e o escurecimento enzimático, causando alterações indesejáveis nas propriedades sensoriais, nutricionais e relacionadas a saúde (RESTUCCIA et al., 2013; MARTÍNEZ-ESPLÁ et al.,

2017). Buscar novas formas de utilizar a alcachofra com tantas propriedades benéficas é aprimorar o conhecimento e valorizar essa fonte.

2.3.3. Utilização da alcachofra na indústria de alimentos

Extratos das flores da alcachofra (*Cynara scolymus*) contêm multiplicidade de formas moleculares de protease aspártica, as quais permitem a coagulação do leite e produção de queijos (LLORENTE et al., 2014; BUENO-GAVILÁ et al., 2020), como também, nas flores do cardo (*Cynara cardunculus* Cardoon Group) que pertencem à mesma família (Asteraceae) da alcachofra. Enzimas extraídas das flores da alcachofra e cardo são utilizadas em produtos lácteos em países como Espanha e Portugal (LLORENTE et al., 2014).

A alcachofra é amplamente utilizada em diferentes receitas e consumida em lugares alimentícios antes da sua floração (ESPOSITO et al., 2016). A indústria de processamento da alcachofra (*Cynara scolymus* L.) gera grandes quantidades de resíduos sólidos agrícolas como as folhas, caules e brácteas. Esses resíduos são geralmente usados como alimento animal e para produção de fibras ou descartados (CONIDI, CASSANO, GARCIA-CASTELLO, 2014). Na busca de novas aplicações para as folhas da alcachofra, foi confirmado que essas fontes contêm quantidades significativas de enzimas proteolíticas em seus extratos (ESPOSITO et al., 2016). O desenvolvimento de genótipos adaptados e com características que atendam às necessidades dos produtores e do mercado consumidor é de grande importância para a maior difusão desta cultura no Brasil (DIDONÉ et al., 2015).

Visto que, as pesquisas sobre a caracterização e aplicação da alcachofra na área de alimentos têm sido voltadas para suas flores, surge o interesse de estudos relacionados a parte comestível e subprodutos. Com isso, podem ser encontradas novas descobertas de uma fonte com indicações tão promissoras, seguindo por exemplo, para extração e pré-purificação ou purificação de enzimas proteolíticas a partir das folhas da alcachofra e com potencial de aplicação na área alimentícia. Para purificação dessas enzimas é utilizado o extrato bruto da planta, e dentre os métodos de purificação podemos citar a extração líquido-líquido.

2.4. Extração Líquido-Líquido

A extração líquido-líquido convencional (ELLC) ou extração por solvente é um método eficaz de preparação de amostras para separação de compostos com diferentes solubilidades em duas fases líquidas imiscíveis. Geralmente, uma fase é água ou solução

tampão e outra fase é solvente orgânico apolar (HEYDARZADEH et al., 2019). Métodos clássicos de separação envolvendo ELLC consistem em transferir seletivamente um ou mais dos solutos desejados contidos em uma solução para o solvente líquido imiscível (HEKAYATI, ROOSTA, JAVANMARDI, 2016).

A possibilidade de utilizar um grande número de diferentes solventes, extratores e fases aquosas são algumas das características da ELLC, sendo um método de separação predominante e atraente (SILVESTRE et al., 2010). A ELLC é uma operação unitária que não submete os materiais do processo a elevadas temperaturas, dessa forma é considerada um método de separação mais apropriado quando estão envolvidas moléculas termossensíveis, além disso, apresenta cinética de extração rápida para muitas separações, adaptabilidade do método a uma variedade de solutos e possibilidade de recuperação de solventes e/ou diluentes (SILVESTRE et al., 2010; HEKAYATI, ROOSTA, JAVANMARDI, 2016).

Embora a ELLC apresente um número significativo de características favoráveis existem pontos negativos que devem ser considerados. Os solventes orgânicos geralmente utilizados na ELLC são inflamáveis, voláteis e apresentam toxicidade, com isso representam sérias ameaças ambientais e a saúde humana. Além dessas desvantagens, têm os custos de capital necessários para implementar medidas de precaução para garantir a segurança do operador durante o processo e aos padrões ambientais; o custo elevado do sistema com a utilização de extratante altamente seletivo; o grande volume de amostra, extratores ou solventes orgânicos que muitas vezes são necessárias; a utilização de solventes orgânicos imiscíveis em água, por apresentarem baixas constantes dielétricas não são capazes de extrair compostos polares (SILVESTRE et al., 2010; HEKAYATI, ROOSTA, JAVANMARDI, 2016; HEYDARZADEH et al., 2019).

Processos de separação são parte integrante de várias indústrias, incluindo alimentos, químicas, farmacêuticas e no tratamento de resíduos. Devido a tendências e mudanças constantes, para que esses setores continuem se mantendo viáveis no mercado precisarão atender cada vez mais a padrões no uso de energia, como também no controle de seus efluentes e capaz de solucionar pontos negativos citados anteriormente (HEKAYATI, ROOSTA, JAVANMARDI, 2016). A extração líquido-líquido por Sistema Aquoso Bifásico pode ser uma alternativa promissora para substituir a ELLC, uma vez que é conhecida por fornecer uma solução economicamente viável para tais demandas.

2.4.1. Sistemas Aquosos Bifásicos

Os Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB's) foram revelados pela primeira vez por Martinus Beijerinck em 1896, ao misturar soluções aquosas a base de ágar (ou amido) e gelatina, descobrindo a formação de um sistema de duas fases, em determinadas faixas de temperatura e concentração dos componentes (RESCHKE, BRANDENBUSCH, SADOWSKI, 2014; IQBAL et al., 2016). O componente majoritário de ambas as fases é a água.

Os SAB's são usados como alternativa limpa para os sistemas tradicionais de extração com solventes orgânicos (SHUKLA, PANDEY, PANDEY, 2018), e têm se destacado em diversas pesquisas devido sua viabilidade ambiental e econômica. Podem ser definidos como sistemas bifásicos que sob condições específicas de temperatura, pressão e composição das soluções se separam em duas fases imiscíveis ou parcialmente miscíveis que estão em equilíbrio termodinâmico (SILVA et al., 2020b). A eficácia dos SAB's depende da extensão da separação das fases que é controlada pela diferença de polaridade das fases constituintes, pH, hidrofobicidade do meio (DAS, SEN, 2012; SHUKLA, PANDEY, PANDEYA, 2018), massa molar, e propriedades do soluto como peso molecular, carga e conformação.

Existem diferentes combinações possíveis de componentes para formação de SAB's, como dois polímeros diferentes (SHIN et al., 2015; SADEGHI, MAALI, 2016), polímero e sal (LU et al., 2008; DAS, SEN, 2012; PEREIRA et al., 2013), sistemas de líquido iônico (PEI et al., 2009), álcool e sal (LO et al., 2015; HUANG et al., 2019), polímero e líquido iônico (JIMÉNEZ et al., 2020; CAMÊLO et al., 2021), copolímero e eletrólito (PENIDO et al., 2019), surfactante e líquido iônico (SILVA et al., 2021), líquido iônico e sal (SHUKLA, PANDEY, PANDEYA, 2018). Os SAB's formados por polímero-polímero (polietileno glicol e dextrana) e polímero-sal (polietileno glicol-sal) são bastante estudados. No entanto, a dextrana apresenta custo elevado o que acaba inviabilizando seu uso em larga escala.

Sistemas com o polímero polietileno glicol (PEG) e sal (sulfatos, fosfatos ou citratos) têm sido atrativos e propostos devido as vantagens significativas, tais como: baixo custo; possibilidade no aumento de escala; baixa viscosidade; elevada seletividade, com menor tempo de separação das fases, já que os componentes apresentam maior diferença de densidade; são atóxicos, não inflamáveis e não voláteis (ASENJO, ANDREWS, 2011; SILVÉRIO et al., 2012; HEKAYATI, ROOSTA, JAVANMARDI, 2016; TAN et al., 2017).

Por outro lado, apresenta limitação como por exemplo, a desnaturação de biomoléculas em altas concentrações de sais (SILVA, LOH, 2006).

Os diversos sistemas oferecem características únicas que podem ser utilizadas para separar e purificar seletivamente solutos desejados, como compostos biológicos, enzimas (SHAHRIARI et al., 2010), proteínas (ALCÂNTARA et al., 2014), proteases (YAVARI et al., 2013; SOUZA JR et al., 2014; WU et al., 2017), lipase (RAMAKRISHNAN et al., 2016), α -amilase (NASCIMENTO et al., 2018). Outras pesquisas relacionadas a separação de biomoléculas de alto valor por meio dos SAB's foram encontradas nas pesquisas de Walter (2012); Carvalho et al., 2017; Bao et al. (2019); Korchak et al. (2020); Pereira, Freire, Coutinho (2020).

Os componentes de tais sistemas consistem principalmente em um polímero (PEG), sal, soluto e água, permitindo a formação de duas fases aquosas que fornecem meio de extração ambientalmente benigno para a separação das moléculas (WALTER, 2012; PEREIRA, FREIRE, COUTINHO, 2020). O alto teor de água nos sistemas acaba fornecendo um meio não destrutivo para separação e recuperação de biomoléculas altamente sensíveis e específicas (WHITE, 2013). Dentre os sais empregados em SAB's na partição de proteínas, com resultados satisfatórios encontra-se o sal fosfato, onde tem sido usualmente explorado (NASCIMENTO et al., 2013; RAMAKRISHNAN et al., 2016; WANDERLEY et al., 2017).

A base da separação em um sistema bifásico é a distribuição seletiva de substâncias entre duas fases e envolve as operações principais: equilíbrio e separação de fases. O equilíbrio é rápido e envolve a mistura dos componentes que constituem o sistema de cada fase, com o material submetido à partição. Logo depois, quando os componentes das fases atingem o equilíbrio nas condições atribuídas, ocorre a separação. A separação das fases por gravidade não é considerada rápida e tem influência da densidade e viscosidade das fases na mistura (SHUKLA, PANDEY, PANDEY, et al., 2018).

2.4.1.1. Parâmetros de partição em Sistemas Aquosos Bifásicos

Alguns parâmetros podem ser avaliados no particionamento de compostos ao utilizar o SAB (ALBERTSSON, 1986). A distribuição da molécula biológica na fase superior e inferior nos Sistemas Aquosos Bifásicos ocorre devido as interações da biomolécula com os componentes do sistema. O parâmetro que caracteriza a razão entre a concentração da molécula na fase superior e inferior é o coeficiente de partição, como demonstrado na

Equação 1. Onde C_{sup} e C_{inf} são as concentrações do soluto na fase superior e inferior, respectivamente.

$$K = \frac{C_{sup}}{C_{inf}} \quad (1)$$

A Equação 2 demonstra o coeficiente de partição da atividade enzimática (K_e) que pode ser encontrado pela relação entre a atividade enzimática na fase superior (A_{sup}) e atividade enzimática na fase inferior (A_{inf}) dos sistemas.

$$K_e = \frac{A_{sup}}{A_{inf}} \quad (2)$$

A seletividade (S) (Equação 3) é um critério avaliado com intuito de verificar a separação de uma molécula de interesse dos demais contaminantes em uma das fases, por meio da relação entre o coeficiente de partição da atividade enzimática (K_e) e o coeficiente de partição de proteína (K_p).

$$S = \frac{K_e}{K_p} \quad (3)$$

O fator de purificação (FP) identifica a capacidade do sistema em purificar o extrato bruto enzimático na fase preferencial do particionamento, como mostrado na Equação 4. O FP é calculado como a razão entre a atividade enzimática específica na fase preferencial e a atividade específica do extrato enzimático bruto. Onde AE é atividade específica da protease na fase e AE_{ext} é a atividade específica do extrato bruto.

$$FP = \frac{AE}{AE_{ext}} \quad (4)$$

O índice de recuperação teórica (Y) estima a eficiência da partição da enzima na fase preferencial, como verificado na Equação 5. Sendo R à razão entre os volumes da fase superior e inferior e K_e o coeficiente de partição de atividade da enzima.

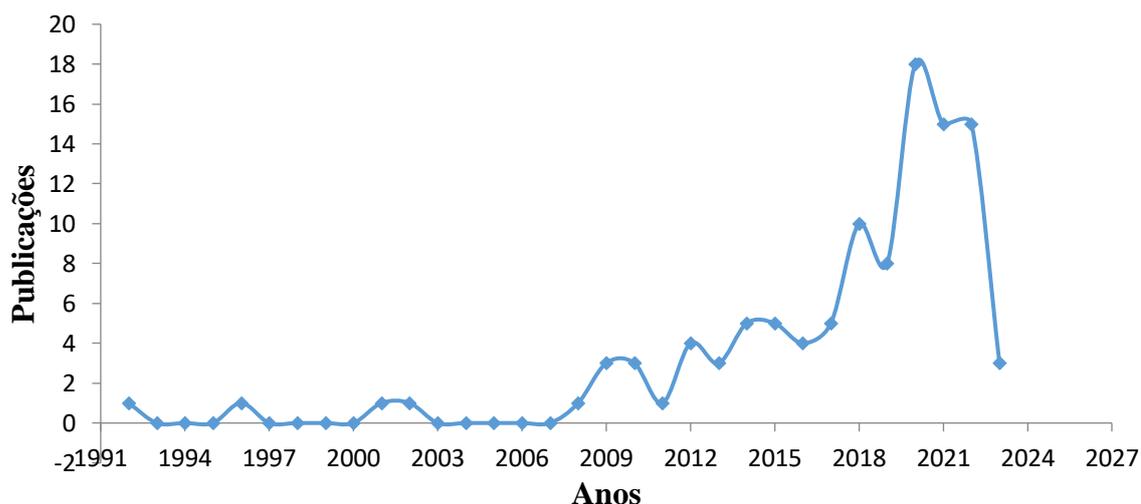
$$Y(\%) = \frac{100}{1 + \left(\frac{1}{RK_e}\right)} \quad (5)$$

A variação da Energia Livre de transferência de Gibbs ($\Delta_t G$) pode ser calculada de acordo com a Equação 6. A $\Delta_t G$ é definida como a mudança de energia livre de Gibbs molar associada ao processo de transferência das proteínas nos Sistemas Aquosos Bifásicos. Onde, T é a temperatura absoluta em que o ensaio é realizado; R é a constante dos gases ideais; e k_e é o coeficiente de partição da atividade enzimática.

$$\Delta_t G (kJ.mol^{-1}) = -RT \ln K_e \quad (6)$$

2.4.1.2. Aplicação de sistemas aquosos bifásicos na purificação de biomoléculas

A partir de uma revisão sistemática da literatura, análises foram realizadas em relação aos 107 artigos encontrados na base de dados Scopus, com a palavra-chave “biomolecules in aqueous biphasic systems”. Esses artigos foram verificados quanto às suas características gerais e de informações mais detalhadas sobre a utilização dos Sistemas Aquosos Bifásicos para obtenção de biomoléculas. Na Figura 5 pode-se visualizar o número de artigos por anos publicados e o crescimento destas pesquisas com o passar do tempo. No período de 1992 até 2007 observa-se apenas 4 publicações relacionadas a palavra-chave citada. A partir do ano 2008 pode-se perceber um crescimento significativo de publicações, com destaque em 2020 (18 artigos/ano), 2021 - 2022 (15 artigos/ano).



Fonte: Autora.

Figura 5. Artigos publicados entre os anos de 1992 e início de 2023.

Devido ao crescente interesse por pesquisas relacionadas a extração, separação, concentração e purificação de biomoléculas por meio da formação de diferentes Sistemas Aquosos Bifásicos, é justificável esse aumento do número de artigos publicados nesta área. Diversos trabalhos têm-se destacado sobre a utilização dos SAB como alternativa da ELL convencional, com necessidade de estratégias e solventes sustentáveis e biocompatíveis, que não apenas permitam o isolamento e purificação parcial ou total de compostos, como também a remoção seletiva de contaminantes (VICENTE et al., 2023).

O SAB tem sido amplamente proposto, pois auxilia nas etapas mencionadas anteriormente para que sejam realizáveis em apenas uma etapa, também é conhecido como uma abordagem simples e econômica, com facilidade no aumento de escala (KEE et al., 2020; PEREIRA, FREIRE, COUTINHO, 2020; SAHA, SARKAR, SEN, 2022). Biomoléculas extraídas e/ou purificadas em condições diversas de Sistemas Aquosos Bifásicos para aplicações alimentares estão descritas em alguns artigos a seguir.

Wu et al. (2017), estudaram a partição da bromelina por meio do SAB com o polímero PEG (4000, 6000, e 8000) g.mol⁻¹ e sal (citrato de sódio e fosfato de potássio). A formação dos SAB's incluiu o peso molecular do PEG, composição das fases e pH. A condição ótima para recuperação da bromelina do extrato bruto foi com PEG 4000, concentração de PEG (C_{PEG}) de 17%, e concentração de sal (C_{SAL}) fosfato 14%; pH de 8,0 e a 25 °C. As proteínas de interesse tiveram preferência com a fase superior (PEG), com resultado do coeficiente de partição da atividade enzimática (K_e) 1,20; fator de purificação (FP) foi 7,0 e índice de recuperação teórica (Y) 54,5%.

Nascimento et al. (2018), analisaram a partição de α -amilase em SAB compostos por polietileno glicol (1500 g.mol⁻¹), soluções estoque de citrato de sódio/ácido cítrico em diferentes temperaturas (303,15 e 313,15) K e pH (4,0, 5,0, 6,0, 7,0). Foi observado que em pH 4,0 os valores do coeficiente de partição das proteínas (K_p) foram maiores que 1, com preferência das proteínas à fase polimérica; em pH 5,0 os valores de K_p foram menores que 1, exibindo uma migração preferencial das proteínas para a fase rica em sal; em pH 6,0 K_p aumentou à medida que a temperatura foi reduzida e em pH 7,0 ocorreu o inverso. Em pH 4,0, 6,0 e 7,0 os resultados de K_e apresentaram valores menores e maiores que 1,0. A recuperação teórica (Y%) variou de 4,377% a 95,373%.

Liu et al. (2019), realizaram a otimização da purificação de celulase a partir de *Bacillus velezensis* por componentes dos SAB's formados por PEG (1500, 4000 e 6000) g.mol⁻¹, em diferentes concentrações de PEG (14%, 22%, 28%) e sal fosfato de potássio em diferentes concentrações (6,5%, 7,5%, 8,5%), e diferentes valores de pH (7,5, 8,0 e 8,5). A

taxa máxima de recuperação da enzima (67,8%) e fator de purificação (1,14) pôde ser alcançada nas condições de PEG 4000 (20,75%), fosfato de potássio (8,5%) e pH 8,5.

Amaral et al. (2020), avaliaram a extração e particionamento de protease de *Aspergillus tamaritii* Kita usando SAB formado por PEG (400, 3350 e 8000) g.mol⁻¹ e citrato de sódio. Foi aplicado um planejamento fatorial completo 2⁴ para encontrar o peso molecular adequado a ser estudado, concentrações de PEG, citrato de sódio e pH. A melhor condição foi a concentração de citrato de sódio 20%, e de PEG 20%, de peso molecular de PEG 400 e pH 8. Nesta condição do SAB foi capaz de pré-purificar a protease, preferencialmente para a fase rica em PEG com K_e 4,6 e FP de 1,6.

Silva et al. (2020) relataram sobre a purificação parcial de proteases das sementes de *Gliricidia sepium* por SAB e utilizaram polietileno glicol (PEG) 8000 g.mol⁻¹ e fosfato de sódio. Foi realizado um planejamento fatorial 2⁴, com variáveis independentes a concentração de PEG (C_{PEG}) e fosfato de sódio (C_{SAL}), massa molar do PEG e pH. Os melhores resultados em termos de purificação parcial da enzima foram obtidos em C_{PEG} de 12,5%, C_{SAL} de 15% e pH 8,0, com resultado de FP 6,26 e K_e 1,32, com partição preferencial de protease para a fase superior rica em PEG.

González-Amado et al. (2021), realizaram uma pesquisa sobre a separação das principais proteínas e lactose do soro de queijos com SAB's formados por polietileno glicol (PEG 200-8000) g.mol⁻¹ e solução salina (sulfato de sódio ou amônio) em diferentes pH. O comportamento da partição mostrou que o sistema formado por PEG 1500 g.mol⁻¹ e sulfato de amônio foi capaz de separar a lactose das proteínas, enquanto o PEG 300 g.mol⁻¹ e sulfato de sódio pôde ser usado para o fracionamento de proteínas.

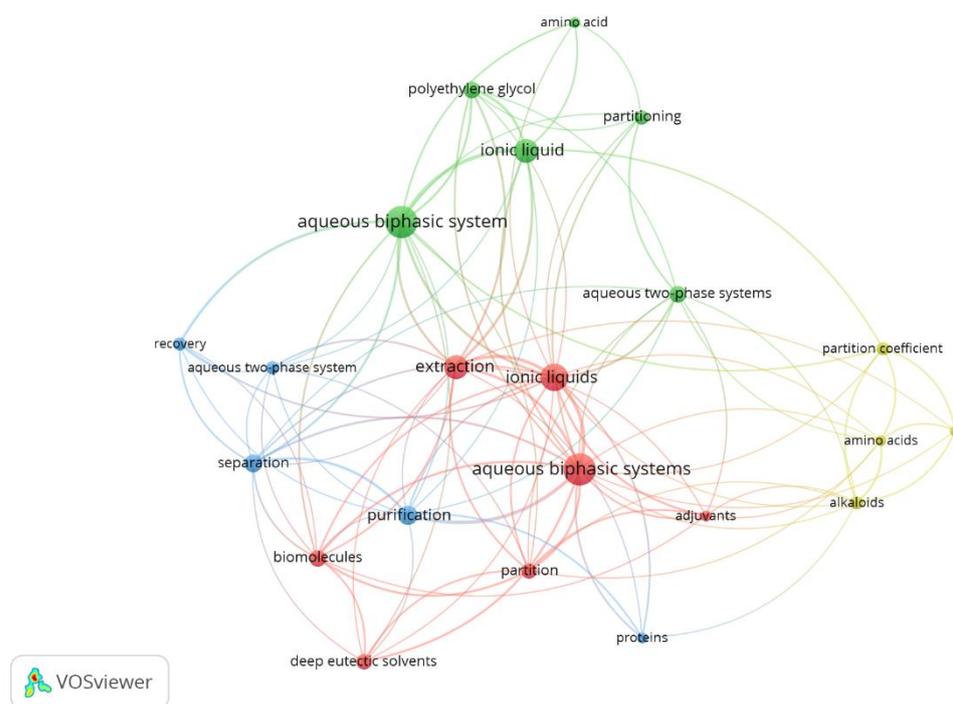
Alves et al. (2021), estudaram a extração da proteases das folhas da ora-pro-nobis e purificação parcial em SAB, formado por polietileno glicol (PEG) 1500 g.mol⁻¹ e 4000 g.mol⁻¹, sal fosfato de sódio e água, em temperatura de 25 °C. Verificaram na condição ideal (PEG 1500 g.mol⁻¹ + fosfato de sódio) que as proteínas com atividade proteolítica permaneceram em maior concentração na fase superior (K_e>1), com K_e 2,709; o coeficiente de partição da proteína (K_p) foi de 0,403; o índice de recuperação teórica (Y) 75,046%, a seletividade (S) com 6,832, fator de purificação (FP) com 1,401, e energia livre de transferência de Gibbs (Δ_tG) -2,468.

Menegotto et al. (2022), pesquisaram sobre a purificação de proteínas de *Arthrospira platensis* por meio dos SAB composto por polietileno glicol (PEG: 1500, 4000, 6000 e 8000) g.mol⁻¹, solução salina (fosfato de potássio e citrato de sódio) e em pH 9,0, sob temperatura a 25 °C. A condição maximizada para recuperação proteica foi estabelecida com citrato de

sódio 16% e PEG 1500 g.mol⁻¹ a 18%, atingindo 1,02 do fator de purificação e 2,18 do coeficiente de partição da proteína.

Pesquisas sobre os Sistemas Aquosos Bifásicos são realizadas há muito tempo e em diversos lugares do mundo. Dessa forma, é um desafio desenvolver uma revisão sobre o assunto de forma global. Em vista disso, foi elaborado uma revisão a partir de dados bibliográficos, isto é, citações e palavras-chaves. As informações foram baixadas da base de dados Scopus e, em seguida, exportadas em formato compatível para o software VOSviewer (versão 1.6.19) onde foram construídos gráficos de rede. O VOSviewer gera mapas bibliométricos baseados em tipos de análises diferenciadas e compilam as informações, na qual permitem a visualização de agrupamentos com características comuns no mapa. Primeiramente, foi escolhida a matriz de co-ocorrência e a unidade de análise foi “palavras-chaves dos autores”. Em segundo momento foi utilizado a informação acoplamento bibliográfica e os países para unidade de análise.

De acordo com os dados estabelecidos inicialmente foi gerado um mapa bibliométrico de campos científicos para análise de palavras-chaves e percebe-se na Figura 6 que foram distribuídas em quatro grupos. Observa-se que a palavra-chave Sistemas Aquosos Bifásicos aparece com maior frequência de ocorrência, em grupos de palavras diferenciadas e interligadas. Algumas palavras citadas e relacionadas aos SAB's em diversos artigos publicados foram as “biomoléculas”, “purificação”, “partição”, líquido iônico”, “extração”, “proteínas”, “polietileno glicol”, “coeficiente de partição”, enfatizando estudos sobre formação de sistemas, particionamento de biomoléculas e análises.



Fonte: Autora

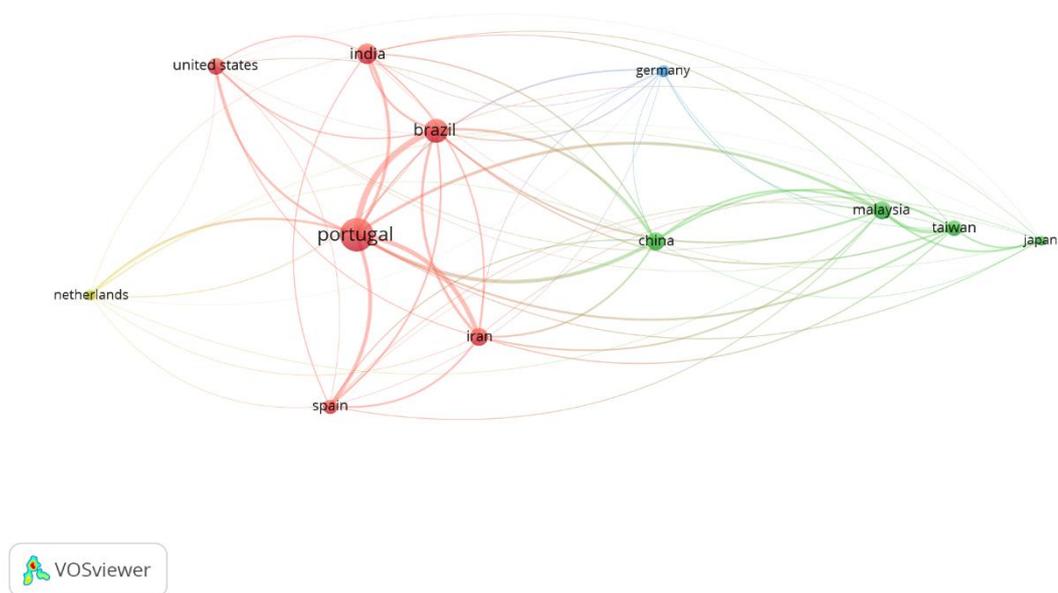
Figura 6. Gráfico de rede com palavras-chaves utilizadas em artigos da área de pesquisa.

A cor dos círculos representa o tipo de agrupamento de cada palavra-chave e o tamanho dos círculos envolve a frequência de ocorrência; a distância indica sua coocorrência, ou seja, uma menor distância entre as palavras-chaves demonstra que aparecem simultaneamente em artigos, já em maior distância não ocorre o mesmo (ECK, WALTMAN, 2023). De maneira geral o software VOSviewer demonstra que os agrupamentos são baseados em distância, ou seja, mapas em que há menores distâncias entre os itens refletem em uma relação mais forte, constatando a identificação de grupos com itens correlacionados (ECK, WALTMAN, 2017). As diferentes cores dos gráficos de rede atribuem aos diferentes tipos de aglomerados, e cada cor é determinada pela sua significância. As cores variam do amarelo na qual representa a pontuação muito baixa, azul pontuação baixa, verde pontuação média e vermelho pontuação alta (ECK, WALTMAN, 2023).

A Figura 7 ilustra a rede de links entre os países nos quais os estudos publicados foram desenvolvidos, em cada círculo significa um país, o tamanho do círculo indica o número de publicações na região correspondente e foram distribuídos em cinco grupos. Para demonstrar as notáveis regiões das instituições de pesquisas relacionadas a biomoléculas em SAB's, o tipo de análise foi o acoplamento bibliográfico dos países. A região em maior

destaque, ou seja, líderes no assunto foi Portugal, com 37 documentos e 2379 citações, em seguida o Brasil com 18 documentos e 519 citações. Outros países consecutivos foram o Iran, Malasia e China.

De forma geral, quanto mais próximos dois países estiveram localizados, mais forte foi a relação entre as pesquisas. Com a análise realizada foi possível auxiliar na identificação das principais regiões que apontaram pesquisas relacionadas às palavras-chaves relevantes da Figura 6, como também, no incentivo e base de futuras pesquisas sobre o tema mencionado, como meio de solucionar problemas e alternativas no setor acadêmico e/ou industrial, além de parcerias entre instituições.

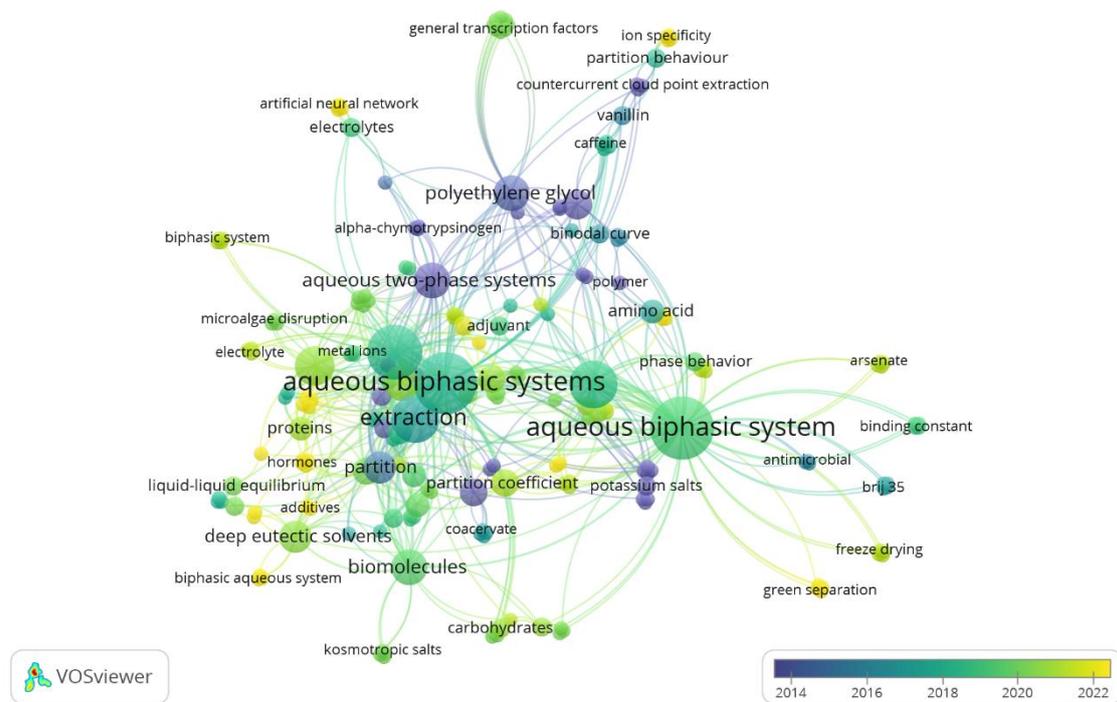


Fonte: Autora.

Figura 7. Gráfico de rede com países que concentram as pesquisas na área.

Conforme a Figura 8 foi possível visualizar o foco de pesquisas em diferentes períodos, as cores (azul ao amarelo) do gráfico de rede puderam revelar essa variação. As palavras-chaves concentraram-se principalmente nos anos 2014 a 2022, dentre esses anos a palavra-chave que mais se destacou foi “Sistemas Aquosos Bifásicos”. Pode-se aferir que os SAB’s se apresentaram em grupos e em faixa de tempo de estudo diferenciados. Nos anos de 2014 a 2016, os SAB tiveram maiores relevâncias em grupo de estudo sobre “curvas binodais”, “particionamento”, utilização do polímero “polietileno glicol”, e outro grupo com “extração” e “partição”. De 2017 a 2020 foi revelado palavras como “biomoléculas”, “coeficiente de partição”, “proteínas”, “equilíbrio líquido-líquido”, “diagrama de fases”,

“solventes”; e “biomoléculas”, “líquido iônico”, “comportamento de fase”. Novas palavras foram reveladas nos anos de 2020 a 2022, como “sistemas bifásicos”, “enzimas”, “liofilização”, e “separação verde”.



Fonte: Autora.

Figura 8. Diagrama de agrupamento de palavras-chaves dos últimos anos para os artigos publicados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Obtenção de proteases a partir das folhas da alcachofra (*Cynara scolymus*) em diferentes métodos e condições, bem como a separação e purificação parcial por meio de Sistemas Aquosos Bifásicos.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Extrair as proteases das folhas da alcachofra mediante o agitador mecânico e banho ultrassônico digital, com diferentes tampões: citrato de sódio, acetato de sódio, Tris-HCl;
- ✓ Determinar o teor de proteínas, atividade proteolítica e específica dos extratos nos diferentes métodos e condições;
- ✓ Analisar a atividade de coagulação do leite e potencial de substituição do coalho dos extratos;
- ✓ Verificar o perfil proteico dos extratos pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e análise de eletroforese;
- ✓ Avaliar os parâmetros da partição das proteases das folhas da alcachofra nos Sistemas Aquosos Bifásicos formados por PEG 1500 g.mol⁻¹, SAL fosfato de sódio e pH, na temperatura de 25 °C;
- ✓ Determinar os modelos estatísticos e gráficos de superfície para os parâmetros de partição;
- ✓ Realizar a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Cromatografia de Exclusão Molecular com o melhor sistema da partição.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADÍA-GARCÍA, L. et al. Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 37, p. 84–90, 2016.
- AFSHARNEZHAD, M.; SHAHANGIAN, S. S.; SARIRI, R. A novel milk-clotting cysteine protease from *Ficus johannis*: Purification and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 173–182, 2019.
- AHMED, I. A. M. et al. Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds. **Food Chemistry**, v. 116, n. 2, p. 395–400, 2009.
- ALBERTSSON, P. Å. Partition of cell particles and macromolecules: separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes, and cells in aqueous polymer two-phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology. 3. ed. New York: Wiley, 1986.
- ALCÂNTARA, L. A. P. et al. Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from cheese whey in aqueous two-phase systems containing poly(ethylene glycol) and sodium polyacrylate. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 4, p. 409–415, 2014.
- ALI, R. et al. Detection and enumeration of Enteric bacteria associated with food handlers and surfaces of food manufacturing industry located in Hub city, Pakistan. v. 49, n. 2, p. 192–203, 2016.
- ALICI, E. H.; ARABACI, G. A novel serine protease from strawberry (*Fragaria ananassa*): Purification and biochemical characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 1295–1304, 2018.
- ALMEIDA, C. M. et al. Engineering a cardosin B-derived rennet for sheep and goat cheese manufacture. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, p. 269–281, 2015.
- ALMEIDA, C. M.; SIMÕES, I. Cardoon-based rennets for cheese production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 11, p. 4675–4686, 2018.
- ALVES, A. N. et al. Extraction of protease from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) and partial purification in polyethylene glycol + sodium phosphate aqueous two-phase system. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 2, p. 1–13, 2021.
- AMARAL, Y. M. S. et al. Production, extraction, and thermodynamics protease partitioning

- from *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 using PEG/sodium citrate aqueous two-phase systems. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 50, n. 6, p. 619–626, 2020.
- AMID, M. et al. Purification of serine protease from mango (*Mangifera Indica* Cv. Chokanan) peel using an alcohol/salt aqueous two phase system. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1382–1386, 2012.
- AMID, M.; ABD MANAP, M. Y.; ZOHDI, N. K. Purification and Characterization of Alkaline-Thermostable Protease Enzyme from Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) Waste: A Potential Low Cost of the Enzyme. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- ARANTES, G. M. A computational perspective on enzymatic catalysis. **Quimica Nova**, v. 31, n. 2, p. 377–383, 2008.
- ARAVIND, G. et al. Traditional and medicinal uses of *Carica papaya*. **Journal of Medicinal Plants Studies**. v. 1, n. 1, p. 7-15, 2013
- ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 49, p. 8826–8835, 2011.
- BAH, C. S. F. et al. Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep and pig plasma using plant and fungal protease preparations. **Food Chemistry**, v. 176, p. 54–63, 2015.
- BCC RESEARCH BIOTECHNOLOGY REPORT. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. Disponível em: <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications.html> Acesso em 2022.
- BALQIS, Z. S.; ROSMA, A. Artocarpus integer leaf protease: Purification and characterisation. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1523–1529, 2011.
- BANIK, S.; BISWAS, S.; KARMAKAR, S. Extraction, purification, and activity of protease from the leaves of *Moringa oleifera* [version 1; peer review: 2 approved, 1 approved with reservations]. **F1000Research**, v. 7, 2018.
- BAO, X. et al. Liquid–Liquid Equilibrium of Imidazolium Ionic Liquids + Phosphate + Water Aqueous Two-Phase Systems and Correlation. **Journal of Solution Chemistry**, v. 48, n. 8–9, p. 1167–1187, 2019.
- BEY, N. et al. The non-edible parts of fennel (*Foeniculum vulgare*) as a new milk-clotting

- protease source. **Industrial Crops and Products**, v. 112, n. June 2017, p. 181–187, 2018.
- BORGOGNONE, D. et al. Salinity source-induced changes in yield, mineral composition, phenolic acids and flavonoids in leaves of artichoke and cardoon grown in floating system. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 6, p. 1231–1237, 2014.
- BRUTTI, C. B. et al. Onopordum acanthium L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. **Lwt**, v. 45, n. 2, p. 172–179, 2012.
- BUENO-GAVILÁ, E. et al. Characterization of proteolytic activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) flower extracts on bovine casein to obtain bioactive peptides. **Animals**, v. 10, n. 5, p. 1–11, 2020.
- CAMÊLO, L. C. A. et al. Pre-purification of genipin from genipap using aqueous-two-phase systems composed of protic ionic liquids + polymers + water at 298 K and atmospheric pressure. **Separation and Purification Technology**, v. 256, n. July 2020, 2021.
- CAMPBELL, K. A. et al. Parameters affecting enzyme-assisted aqueous extraction of extruded sunflower meal. **Food Chemistry**, v. 208, p. 245–251, 2016.
- CARVALHO, T. et al. Evaluating aqueous two-phase systems for *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase purification. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 259–266, 2017.
- CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S.; BENJAKUL, S. Extraction of protease from *Calotropis procera* latex by polyethylene glycol-salts biphasic system. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1148–1155, 2010.
- CHÁVEZ-GARAY, D. R. et al. Partial characterization of a plant coagulant obtained from the berries of *Solanum elaeagnifolium*. **CYTA - Journal of Food**, v. 14, n. 2, p. 200–205, 2016.
- CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; MEULLEMIESTRE, A.; TURCO, M. ; PERINO, S.; FABIANO-TIXIER, A. S.; ABERT-VIAN, M. Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 41, p. 357-377, 2017.
- CHEN, Y. et al. Characterization of functional proteases from flowers of tea (*Camellia sinensis*) plants. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 149–159, 2016.
- CONIDI, C.; CASSANO, A.; GARCIA-CASTELLO, E. Valorization of artichoke wastewaters by integrated membrane process. **Water Research**, v. 48, n. 1, p. 363–

374, 2014.

- CONTESINI, F. J.; MELO, R. R. DE; SATO, H. H. An overview of Bacillus proteases: from production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 321–334, 2018.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimento de Fennema**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.
- DAS, D.; SEN, K. Species dependent aqueous biphasic extraction of some heavy metals. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 855–859, 2012.
- DÍAZ-VILLANUEVA, J. F.; DÍAZ-MOLINA, R.; GARCÍA-GONZÁLEZ, V. Protein folding and mechanisms of proteostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 17193–17230, 2015.
- DIDONÉ, S. F. et al. Artichoke micropropagation from in vitro germinated seedlings. **Horticultura Brasileira**, v. 33, p. 1806–9991, 2015.
- DORIYA, et al. Solid-state fermentation vs submerged fermentation for the production of l-asparaginase. *Adv Food Nutr*, 2016.
- ECK, N. J. VAN; WALTMAN, L. Citation-based clustering of publications using CitNetExplorer and VOSviewer. **Scientometrics**, v. 111, n. 2, p. 1053–1070, 2017.
- ECK N. J. V.; WALTMAN L. Manual for VOSviewer version 1.6.19. 2023.
- EL-GENDI, H. et al. A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 1, 2022.
- ELSEBAI, M. F. et al. The wild Egyptian artichoke as a promising functional food for the treatment of hepatitis C virus as revealed: Via UPLC-MS and clinical trials. **Food and Function**, v. 7, n. 7, p. 3006–3016, 2016.
- ESPOSITO, M. et al. Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease. **Food Chemistry**, v. 204, p. 115–121, 2016.
- FAHEEM, M. et al. Functional and structural characterization of a novel putative cysteine protease cell wall-modifying multi-domain enzyme selected from a microbial metagenome. **Scientific Reports**, v. 6, n. December, p. 1–14, 2016.
- FALCO, B. et al. Artichoke: botanical, agronomical, phytochemical, and pharmacological

- overview. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 6, p. 993–1018, 2015.
- FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: < <https://www.fao.org/faostat/en/#home> >, acesso em 2022.
- FEIJOO-SIOTA, L.; VILLA, T. G. Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 6, p. 1066–1088, 2011.
- FERNÁNDEZ-LUCAS, J.; CASTAÑEDA, D.; HORMIGO, D. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 68, n. 2017, p. 91–101, 2017.
- GONZÁLEZ-AMADO, M. et al. Recovery of lactose and proteins from cheese whey with poly(ethylene)glycol/sulfate aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 255, n. August 2020, 2021.
- GONZÁLEZ-RÁBADE, N. et al. Production of plant proteases in vivo and in vitro - A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 983–996, 2011.
- GUIAMA, V. D. et al. Milk-coagulating extract produced from solanum aethiopicum shum fruits: Multivariate techniques of preparation, thermal stability and effect on milk solids recovery in curd. **International Journal of Food Engineering**, v. 10, n. 2, p. 211–222, 2014.
- GURUMALLESH, P. et al. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 2018, p. 254–267, 2019.
- HA, M. et al. Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 95–105, 2012.
- HARTMEIER, W. (1988) Immobilized biocatalysts: an introduction. Berlin: Springer Verlag.
- HEKAYATI, J.; ROOSTA, A.; JAVANMARDI, J. Liquid-liquid equilibria in the quinary aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) 6000 + sodium sulfate + water in the presence of glucose and ethanol: Experimental investigation and thermodynamic modeling. **Thermochimica Acta**, v. 625, p. 47–52, 2016.
- HEYDARZADEH, M. et al. Salt-assisted liquid–liquid extraction in microchannel. **Journal of Separation Science**, v. 42, n. 20, p. 3217–3224, 2019.

- HSIAO, N. W. et al. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus Oryzae* protease extract, peptidase R. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 89–94, 2014.
- HUANG, A. et al. Hexafluoroisopropanol-salt aqueous two-phase system for extraction and purification of chlorogenic acid from ramie leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1597, p. 196–201, 2019.
- HUSSAIN, S. et al. Protease inhibitors purified from the canola meal extracts of two genetically diverse genotypes exhibit antidiabetic and antihypertension properties. **Molecules**, v. 26, n. 7, 2021.
- IERNA, A.; MAURO, R. P.; MAUROMICALE, G. Improved yield and nutrient efficiency in two globe artichoke genotypes by balancing nitrogen and phosphorus supply. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, n. 3, p. 773–780, 2012.
- INACIO, F. D. et al. Proteases of wood rot fungi with emphasis on the genus *Pleurotus*. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- IQBAL, M. et al. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 1, p. 1–18, 2016.
- JACOB, M., JAROS, D., ROHM, H. "Recent advances in milk clotting enzymes." **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 1, p. 14-33, 2011.
- JAMEHBOZORG, B.; SADEGHI, R. Extractions of Alkaloids Codeine and Caffeine with [Bmim][BF₄]/Carbohydrate Aqueous Biphasic Systems as a Novel Class of Liquid-Liquid Extraction Systems. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 64, n. 3, p. 916–925, 2019.
- JIMÉNEZ, Y. P. et al. Phase equilibrium for polymer/ionic liquid aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 506, 2020.
- JONES, B. L. Endoproteases of barley and malt. **Journal of Cereal Science**, v. 42, n. 2, p. 139–156, 2005.
- KATSAROS, G.I.; TAVANTZIS, G.; TAOUKIS, O. S. Production of novel dairy products using actinidin and high pressure as enzyme activity regulator. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 1 p. 47–51, 2010.
- KEE, P. E. et al. Recent development of unconventional aqueous biphasic system: characteristics, mechanisms and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 40, n. 4, p. 555–569, 2020.

- KINGSLEY, L. J.; LILL, M. A. Substrate tunnels in enzymes: Structure-function relationships and computational methodology. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 83, n. 4, p. 599–611, 2015.
- KORCHAK, P. A. et al. Liquid-liquid equilibria of aqueous biphasic systems containing 1-alkyl-3-methylimidazolium amino acid ionic liquids with different anions (L-Leucine, L-Valine, L-Lysine) and inorganic salt (tripotassium phosphate, potassium carbonate). **Fluid Phase Equilibria**, v. 525, 2020.
- KUMARI, M.; SHARMA, A.; JAGANNADHAM, M. V. Religiosin B , a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1295–1303, 2012.
- LATTANZIO, V. et al. Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 2, p. 131–144, 2009.
- LI, X. et al. Structure of a presenilin Family intramembrane aspartate protease. **Nature**, v. 493, p. 56-61, 2013.
- LIMA, A. S.; SANTANA, C. C. P. Processos de Extração e purificação de Biomoléculas. Aracaju-Sergipe: Editora Universitária Tiradentes, 2017.
- LIN, B.; WANG, S.; ZHOU, A.; HU, Q.; HUANG, G. Ultrasound-assisted enzyme extraction and properties of Shatian pomelo peel polysaccharide. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 98, p.106-507, 2023.
- LIU, Y. et al. Optimize purification of a cellulase from *Bacillus velezensis* A4 by aqueous two-phase system (ATPS) using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 87, n. April, p. 196–203, 2019.
- LLORENTE, B. E. et al. Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases. **Food Chemistry**, v. 159, p. 55–63, 2014.
- LO, S. C. et al. Liquid-Liquid Equilibrium of Alcohols + Ammonium/Potassium/Sodium Acetate + Water Systems: Experimental and Correlation. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 60, n. 10, p. 2848–2857, 2015.
- LU, T. et al. Aqueous surfactant two-phase systems in a mixture of cationic gemini and anionic surfactants. **Langmuir**, v. 24, n. 19, p. 10723–10728, 2008.
- LUFRAÑO, D. et al. Molecular cloning and characterization of procirsin, an active aspartic protease precursor from *Cirsium vulgare* (Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 81, p. 7–

18, 2012.

- LUTZ, M.; HENRÍQUEZ, C.; ESCOBAR, M. Chemical composition and antioxidante properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 49–54, 2011.
- MADHU, C. S.; SHARADA, A. C. Fibrinogenolytic activity of serine proteases(s) from *Cucumis dipsaceus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 685–689, 2019.
- MAHAJAN, R. T.; BADGUJAR, S. B. Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 9, p. 2048–2068, 2010.
- MANDUJANO-GONZÁLEZ, V. et al. Aspartil-proteasas secretadas por hongos: revisión. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, n. 2, p. 76–82, 2016.
- MARQUES, M. R. F. Bioquímica / Maria Risoleta Freire Marques. — 1. ed. revisada — Florianópolis : BIOLOGIA/EAD/UFSC, p. 182, 2014.
- MARKET INTELLIGENCE. Global Industrial Enzymes Market (Study Period: 2017-2027). Chemicals and Materials. 2021.
- MARTÍNEZ-ESPLÁ, A. et al. Preharvest application of oxalic acid improves quality and phytochemical content of artichoke (*Cynara scolymus* L.) at harvest and during storage. **Food Chemistry**, v. 230, p. 343–349, 2017.
- MAZORRA-MANZANO, M. A. et al. Sour orange *Citrus aurantium* L. flowers: A new vegetable source of milk-clotting proteases. **Lwt**, v. 54, n. 2, p. 325–330, 2013.
- MAZZEO, G. et al. Insect pollinators improve seed production in globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*). **Annals of Applied Biology**, v. 176, n. 3, p. 241–248, 2020.
- MEHDI, W. A. et al. Levels of antioxidant enzymes and alkaline protease from pulp and peel of sunflower. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 6, p. 533–537, 2017.
- MEHRNOUSH, A. et al. Optimization of serine protease purification from mango (*Mangifera Indica* cv. chokanan) peel in polyethylene glycol/dextran aqueous two phase system. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3636–3649, 2012.
- MEHRNOUSH, A.; MUSTAFA, S.; YAZID, A. M. M. “Heat-treatment aqueous two phase

- system” for purification of serine protease from kesinai (*Streblus Asper*) leaves. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 10202–10213, 2011.
- MENEGOTTO, A. L. L. et al. Protein purification of *Arthrospira platensis* using aqueous two-phase system composed of polyethylene glycol and potassium phosphate/sodium citrate. **Journal of Applied Phycology**, v. 34, n. 1, p. 311–320, 2022.
- MORDOR INTELLIGENCE. Mercado de enzimas industriais. Disponível em: < <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/industrial-enzymes-market> > Acesso em 2023a.
- MORDOR INTELLIGENCE. Mercado de proteases - crescimento, tendências, impacto do covid-19 e previsões (2023-2028). Disponível em: < <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/proteases-market> >, Acesso em 2023b.
- MORDOR INTELLIGENCE. Tamanho do mercado proteases & análise de participação – tendências de crescimento e previsões (2023 - 2028). Disponível em: < [https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/proteases-market#:~:text=Espera%2Dse%20que%20o%20tamanho,previs%C3%A3o%20\(2023%2D2028\).>](https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/proteases-market#:~:text=Espera%2Dse%20que%20o%20tamanho,previs%C3%A3o%20(2023%2D2028).>), Acesso em 2023c.
- NADAR, S. S.; PAWAR, R. G.; RATHOD, V. K. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 931–957, 2017.
- NASCIMENTO, C. O. et al. Aqueous two-phase systems: New strategies for separation and purification of lectin from crude extract of *Cratylia mollis* seeds. **Separation and Purification Technology**, v. 116, p. 154–161, 2013.
- NASCIMENTO, M. B. DO et al. Equilibrium data and thermodynamic studies of α -amylase partition in aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 463, p. 69–79, 2018.
- NÉSTOR, G. M.; DELY RUBÍ, C. G.; HÉCTOR, J. C. Exploring the milk-clotting properties of a plant coagulant from the berries of *S. elaeagnifolium* var. Cavanilles. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, p. 89–94, 2012.
- NICOSIA, F. D. et al. Plant Milk-Clotting Enzymes for Cheesemaking. **Foods**, v. 11, n. 6, p. 1–16, 2022.
- NOVOZYMES. Novozymes Viscozyme L for vegetable and fruit processing. p. 1–5, 2020.

- OLIVEIRA, A. C. et al. Study of liquid-liquid equilibria in aqueous two-phase systems formed by poly (ethylene glycol) (PEG) and sodium thiosulfate pentahydrate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) at different temperatures. **Fluid Phase Equilibria**, v. 476, p. 118-125, 2018.
- OLIVEIRA FILHO, D. C. et al. Synthesis of proteases by a species of anamorphic filamentous fungus for application in industrial. v. 11, n. 16, p. 1–7, 2022.
- ORDIALES, E. et al. Influence of the technological properties of vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) on the physicochemical, sensory and rheological characteristics of “Torta del Casar” cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 67, n. 3, p. 402–409, 2014.
- OZTURKOGLU-BUDAK, S. et al. Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe’s milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 237, p. 17–27, 2016.
- PALMA, J. M. et al. Plant proteases , protein degradation , and oxidative stress : role of peroxi ... Plant Physiology and Biochemistry Plant proteases , protein degradation , and oxidative stress : role of Plant proteases , protein degradation , and oxidative stress : role. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 40, p. 521–530, 2002.
- PANDINO, G. et al. Caffeoylquinic acids and flavonoids in the immature Inflorescence of globe artichoke, wild cardoon, and cultivated cardoon. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 1026–1031, 2010.
- PAVAN, R. et al. Properties and Therapeutic Application of Bromelain: A Review. **Biotechnology Research International**, v. 2012, p. 1–6, 2012.
- PEI, Y. et al. Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction of selected proteins. **Separation and Purification Technology**, v. 64, n. 3, p. 288–295, 2009.
- PENIDO, J. A. et al. Surfactant as selective modulator in the partitioning of dyes in aqueous two-phase systems: A strategy for separation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 293, p. 111501, 2019.
- PEREIRA, J. F. B. et al. Extraction of tetracycline from fermentation broth using aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and cholinium-based salts. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 4, p. 716–722, 2013.
- PEREIRA, J. F. B.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. Aqueous two-phase systems: Towards novel and more disruptive applications. **Fluid Phase Equilibria**, v. 505,

2020.

- PESCE, G. R.; MAUROMICALE, G. *Cynara cardunculus* L.: Historical and economic importance, botanical descriptions, genetic resources and traditional uses. In E. Portis, A. Acquadro, & S. Lanteri (Eds.), *The globe artichoke genome. Compendium of plant genomes*, p. 1–19, 2019.
- PUGLISI, I.; PETRONE G.; LO PIERO A. R. A kiwi juice aqueous solution as coagulant of bovine milk and its potential in Mozzarella cheese manufacture. **Food Bioproducts Processing**, v. 92, n. 1, p. 67-72, 2014.
- RAMAKRISHNAN, V. et al. Extraction and purification of lipase from *Enterococcus faecium* MTCC5695 by PEG/phosphate aqueous-two phase system (ATPS) and its biochemical characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 19–27, 2016.
- RAMALHO E. X. et al. Enzimas: as proteínas operárias que fazem a vida funcionar e movimentam um mercado bilionário. 2020. Disponível em: < <https://www.bioquimicadealimentosunicamp.com/post/enzimas-as-prote%C3%ADnas-oper%C3%A1rias-que-fazem-a-vida-funcionar-e-movimentam-um-mercado-bilion%C3%A1rio> >, acesso em 2021.
- RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, v. 62, n.3, p.597-635, 1998.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: The peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. SUPPL.1, p. 227–233, 2010.
- RAZZAQ, A. et al. Microbial proteases applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. JUN, p. 1–20, 2019.
- RESCHKE, T.; BRANDENBUSCH, C.; SADOWSKI, G. Modeling aqueous two-phase systems: I. Polyethylene glycol and inorganic salts as ATPS former. **Fluid Phase Equilibria**, v. 368, p. 91–103, 2014.
- ROSSO, B. U. et al. Partitioning and extraction of collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* in poly(ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase system. **Fluid Phase Equilibria**, v. 335, p. 20–25, dez. 2012.
- SADEGHI, R.; MAALI, M. Toward an understanding of aqueous biphasic formation in polymer-polymer aqueous systems. **Polymer**, v. 83, p. 1–11, 2016.
- SAHA, N.; SARKAR, B.; SEN, K. Aqueous biphasic systems: A robust platform for green

- extraction of biomolecules. **Journal of Molecular Liquids**, v. 363, p. 119882, 2022.
- SAID, S.; PIETRO, R.; Enzimas de Interesse industrial e biotecnológico, Ed Eventos: Rio de Janeiro, 2002.
- SAMPAIO, V. S. Dados de equilíbrio e modelagem de sistemas aquosos bifásicos formados por PEG e sais de sulfato em pH 2 e sua aplicação para partição de proteases. Itapentiga, BA: UESB, 2019. 88 p. Tese. (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos).
- SANTOS, A. F. et al. Peptidases em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria. Editora Edgard Blücher Ltda. 2016.
- SAYALI, K.; SADICHHA, P.; SUREKHA, S. Microbial Esterases : An overview. **J . Curr . Microbiol . App . Sci**, v. 2, n. 7, p. 135–146, 2013.
- SCHALLER, A. A cut above the rest: The regulatory function of plant proteases. **Planta**, v. 220, n. 2, p. 183–197, 2004.
- SHAH, M. A.; MIR, S. A.; PARAY, M. A. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: A review. **Dairy Science and Technology**, v. 94, n. 1, p. 5–16, 2014.
- SHAHRIARI, S. et al. Measurement of partition coefficients of β -amylase and amyloglucosidase enzymes in aqueous two-phase systems containing poly(ethylene glycol) and Na₂SO₄/KH₂PO₄ at different temperatures. **Fluid Phase Equilibria**, v. 292, n. 1–2, p. 80–86, 2010.
- SHARMA, K. M. et al. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 115–126, 2017.
- SHIN, H. et al. High-yield isolation of extracellular vesicles using aqueous two-phase system. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–11, 2015.
- SHUKLA, S. K.; PANDEY, S.; PANDEY, S. Applications of ionic liquids in biphasic separation: Aqueous biphasic systems and liquid–liquid equilibria. **Journal of Chromatography A**, v. 1559, p. 44–61, 2018.
- SILVA, A. V. et al. Partial purification of fibrinolytic and fibrinogenolytic protease from *Gliricidia sepium* seeds by aqueous two-phase system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 27, n. June, 2020a.
- SILVA, L. H. M. DA; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para

- partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1345–1351, 2006.
- SILVA, L. L. B. et al. Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase systems formed by non-ionic surfactant (Triton X-165 or Triton X-305) and ionic liquid based on the choline cation (choline bitartrate or choline dihydrogen citrate). **Journal of Molecular Liquids**, v. 318, p. 114030, 2020b.
- SILVA, S. J. B. E. et al. Use of aqueous two-phase systems formed by Triton X and choline chloride for extraction of organic and inorganic arsenic. **Separation and Purification Technology**, v. 263, n. July 2020, p. 118082, 2021.
- SILVÉRIO, S. C. et al. Lysozyme and bovine serum albumin partitioning in polyethylene glycol-phenylalanine conjugate polymer/salt aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 322–323, p. 19–25, 2012.
- SILVESTRE, C. I. C. et al. Exploitation of a single interface flow system for on-line aqueous biphasic extraction. **Talanta**, v. 81, n. 4–5, p. 1847–1851, 2010.
- SIRITAPETAWE, J. et al. A novel serine protease with human fibrinolytic activities from *Artocarpus heterophyllus* latex. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1824, n. 7, p. 907–912, 2012.
- SOARES D.F, A. et al. Potencial do latex da fruta pão (*Artocarpus altilis*) como agente coagulante do leite Potential of breadfruit (*Artocarpus altilis*) latex as a milk-clotting agent. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 45, n. 1, p. 149–154, 2015.
- SOMAVARAPU, S.; VEMULA, S.; REDDY, I. B. Extraction, purification and characterization of a novel cysteine protease from the latex of plant *Vallisneria spiralis*. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 186–198, 2018.
- SOUZA JR, E. C. DE et al. Recovery of casein-derived peptides with in vitro inhibitory activity of angiotensin converting enzyme (ACE) using aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 973, p. 84–88, 2014.
- SUN, Q. et al. Comparative analysis on the distribution of protease activities among fruits and vegetable resources. **Food Chemistry**, v. 213, p. 708–713, 2016.
- TAN, Z. et al. Chiral separation of mandelic acid enantiomers using an aqueous two-phase system based on a thermo-sensitive polymer and dextran. **Separation and Purification Technology**, v. 172, p. 382–387, 2017.
- ULLAH, N. et al. Purification, Characterization, and Application of Alkaline Protease

- Enzyme from a Locally Isolated *Bacillus cereus* Strain. **Fermentation**, v. 8, n. 11, p. 628, 2022.
- ULLMANN, S. Principais Produtores de Alcachofra. Disponível em: < <https://www.ufrgs.br/alimentus1/feira/mphorta/alcachofra/estados.htm> >, acesso em 2022.
- VERÍSSIMO, P. et al. Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. **European Journal of Biochemistry**, 235(3):762-768, 1996.
- VERÍSSIMO, P. et al. The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. **Biotechnology Letters**, 17(6):621-626, 1995.
- VICENTE, F. A. et al. Aqueous biphasic systems as a key tool for food processing. **Food Science**, v. 50, p. 1–24, 2023.
- WALTER, H.: Partitioning in Aqueous Two-Phase System: Theory, Methods, Uses, and Applications to Biotechnology. Elsevier, Amsterdam, 2012.
- WANDERLEY, M. C. DE A. et al. Purification and characterization of a collagenase from *Penicillium* sp. UCP 1286 by polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase system. **Protein Expression and Purification**, v. 133, p. 8–14, 2017.
- WEN, C. et al. Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 105, n. August, p. 308–322, 2020.
- WHITE, J. B. Aqueous Two-Phase Systems for Next-Generation Biotechnological Assays, University of Michigan, 2013, Ph.D. Thesis.
- WILDERMAN, P. R. et al. Investigation by site-directed mutagenesis of the role of cytochrome P450 2B4 non-active-site residues in protein-ligand interactions based on crystal structures of the ligand-bound enzyme. **FEBS Journal**, v. 279, n. 9, p. 1607–1620, 2012.
- WU, W. C. et al. Single step purification of bromelain from *Ananas comosus* pulp using a polymer/salt aqueous biphasic system. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 79, p. 158–162, 2017.
- YADAV, R. P.; PATEL, A. K.; JAGANNADHAM, M. V. Neriifolin S, a dimeric serine protease from *Euphorbia neriifolia* Linn.: Purification and biochemical

characterisation. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1296–1304, 2012.

YANG, X. et al. Heterologous expression of an aspartic protease gene from biocontrol fungus *Trichoderma asperellum* in *Pichia pastoris*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 11, p. 2087–2094, 2013.

YAVARI, M. et al. Partitioning of alkaline protease from *Bacillus licheniformis* (ATCC 21424) using PEG-K₂HPO₄ aqueous two-phase system. **Fluid Phase Equilibria**, v. 337, p. 1–5, 2013.

ZHAO, Q. et al. A. Proteomics analysis of the bio-functions of *Dregea sinensis* stems provides insights regarding milk-clotting enzyme. **Food Research International**, v. 144, p. 110340, 2021.

ZIKIOU, A. et al. Algerian cardoon flowers express a large spectrum of coagulant enzymes with potential applications in cheesemaking. **International Dairy Journal**, v. 105, p. 1–8, 2020.

ARTIGO PUBLICADO
ARTICHOKE LEAF EXTRACTS: PROTEOLYTIC ACTIVITY, COAGULANT
AND HPLC ANALYSIS

SILVA, G. M. DE S. et al.

Food Science and Technology . Science and Agrotechnology.

v. 45, p. 1981–1829, 2021.

<https://doi.org/10.1590/1413-7054202145001721>

ABSTRACT

The search for origin plant-based proteases increases gradually due to their diversity and stability over a wide range of pH and temperature. Artichoke (*Cynara scolymus*) flowers are a proteolytic vegetable source already studied, but their leaves are scarce in this respect. Thus, the objective of this research was to obtain extracts of artichoke leaves with different buffers and extraction methods as an alternative proteolytic source and plant coagulant, as well as the separation and comparison of the protein profile of these extracts. The methodology used was based on extraction with sodium citrate buffer (pH 3), sodium acetate (pH 5) and Tris-HCl (pH 7) by mechanical stirrer (MS) and ultrasound (US); protein determination; proteolytic activity (PA) and specific activity (SA); milk clotting activity (MCA) and rennet substitution potential (RSP); high- performance liquid chromatography analysis (HPLC) with UV-Vis detector and principal component analysis (PCA). Extracts of *Cynara scolymus* leaves showed high results with Citrate-US for the parameters PA (14.38), SA (19.71), MCA (440) and RSP (30.60) compared to other treatments. The extracts with citrate and acetate had a quick coagulation time (max 3 min). The HPLC analysis enabled the separation of the different protein compounds present in the extracts and most expressive peaks in the samples with Citrate-MS and Acetate-MS; and isolated peaks for Citrate-US. It was concluded that extracts of artichoke leaves with citrate and acetate buffer attributed satisfactory results to act as plant coagulant, as well as to carry out further studies for the purification of proteolytic enzymes and application in cheeses.

Index terms: Extraction methods; protein compounds; chromatography; principal component analysis; *Cynara scolymus*.

EXTRATOS DAS FOLHAS DA ALCACHOFRA: ATIVIDADE PROTEOLÍTICA, COAGULANTE E ANÁLISE POR HPLC

RESUMO

A busca por proteases de origem vegetal aumenta gradualmente devido à sua diversidade e estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura. As flores (*Cynara scolymus*) da alcachofra são uma fonte vegetal proteolítica já estudada, porém suas folhas são escassas nesse aspecto. Assim, o objetivo dessa pesquisa foi a obtenção de extratos das folhas da alcachofra com diferentes tampões e métodos de extração como fonte alternativa proteolítica e coagulante vegetal, bem como a separação e comparação do perfil proteico desses extratos. A metodologia utilizada foi baseada na extração com tampão de citrato de sódio (pH 3), acetato de sódio (pH 5) e tris-HCl (pH 7), por agitação mecânica (AM) e ultrassom (US); determinação de proteínas; atividade proteolítica (AP) e atividade específica (AE); atividade de coagulação do leite (ACL) e potencial de substituição do coalho (PSC); análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector UV-Vis e análise de componentes principais (ACP). Os extratos das folhas *Cynara scolymus* apresentaram resultados elevados no extrato com Citrato-US para os parâmetros AP (14,38), AE (19,71), ACL (440) e PSC (30,60) comparados aos demais tratamentos. Os extratos com citrato e acetato tiveram tempo de coagulação rápido (máx 3 min). A análise de HPLC possibilitou a separação dos diferentes compostos proteicos presentes nos extratos e picos mais expressivos nas amostras com Citrato-AM e Acetato-AM; e picos isolados para o Citrato-US. Conclui-se que os extratos das folhas da alcachofra com o tampão citrato e acetato atribuíram resultados satisfatórios para atuarem como coagulante vegetal, bem como para realização de novos estudos para purificação de enzimas proteolíticas e aplicação em queijos.

Termos para indexação: Métodos de extração; compostos proteicos; cromatografia; análise de componentes principais; *Cynara scolymus*.

1. INTRODUCTION

The enzymes are usually used in the industries and among the ones that stand out are Hydrolases, with emphasis on carbohydrates, lipases and proteases. Proteases also called peptidases or proteinases are enzymes that hydrolyze the peptide bonds between the amino acids of proteins (Sun et al., 2016). They represent the most important and commercialized class of enzymes in the world, with more than 60% market share and an annual growth rate of 5.3% from 2014 to 2019. In the food industry can be applied as milk coagulants for cheese production, beer production, production of protein hydrolysates, baking industry and manufacture of artificial sweeteners. Proteases are widely distributed among animals, microorganisms and plants and perform important biological functions and physiological processes for living organisms (Fernández-Lucas; Castañeda; Hormigo, 2017).

Coagulation of milk by enzymatic action is a basic step in the manufacture of most cheeses and the addition of rennet or coagulant agents is widely used. Chymosin is the main and oldest enzyme used for the coagulation of milk present in calf rennet and widely applied to cheese production (Esposito et al., 2016; Abebe; Emire, 2020). Enzymes from microbial sources represent an adequate substitute for animal rennet, however there is a reduction in the thermal stability of these enzymes by the application of chemical modifications or by the use of genetic engineering in the microbial organism (Ahmed; Babiker; Mori, 2010; Yegin; Dekker 2013).

The restrictions of lactovegetarian consumers and for genetically modified foods, as well as religious issues (Islam and Judaism) and changes in eating habits limit the use of animal and microbial rennet (Shah; Mir; Paray, 2014). Besides that, the worldwide increase in cheese processing and the decline in the supply of rennet has led to the search for new proteolytic alternatives of coagulant activity capable of satisfactorily replacing this rennet (Shah; Mir; Paray, 2014; Abebe; Emire, 2020). Thus, increasing attention has been directed toward natural rennet extracted from vegetables with increasing interest in the cheese industry due to its easy availability and simple extraction and purification procedures (Ahmed; Babiker; Mori, 2010).

The species *Cynara cardunculus* consists of the artichoke. *C. cardunculus* subsp. *scolymus*, the cultivated cardoon, *C. cardunculus* subsp. *altilis*, and the wild cardoon, *C. cardunculus* subsp. *Sylvestris* (Falco et al., 2015). The artichoke *Cynara scolymus* L. is a perennial herbaceous crop, belonging to the asteraceae family and originated from the Mediterranean basin, where it has been cultivated for thousands of years and diffused all

over the world (Falco et al., 2015; Mazzeo et al., 2020). The edible part ("head") of the plant is an immature inflorescence, used as a fresh, frozen or canned food (Mazzeo et al., 2020). Artichoke flowers are mainly used in the production of proteolytic extracts for cheese applications, due to their high plant coagulant activity characteristic of the presence of aspartic proteases in the flowers, known as cardosins and cyprosins (Almeida; Simões, 2018; Llorente et al., 2014). The leaves are more used in herbal extracts due to their beneficial and therapeutic effects (Lattanzio et al., 2009).

The stems and leaves represent about 80 to 85% of the total fresh weight of the plant and are the most abundant by-products of the artichoke industrial processing that generates large amount of discarded material (Lattanzio et al., 2009). For economic and environmental reasons, adding value to agro-industrial by-products is of great interest. The increase in the search for new sources of plant proteases with high activity and stability is one of the challenges for industrial applications, because the plants have multiple components with different characteristics (Kumari; Sharma; Jagannadham, 2012). Thus, analyzes are needed to assist in the separation and characterization of these compounds.

Among the methods used for protein separation is the High-performance Liquid Chromatography (HPLC), which in addition to versatility has a high analytical capacity. The technique uses a liquid mobile phase responsible for separating the sample components that will flow through a column and providing data on the separation of the compounds (Coskun, 2016; Liu et al., 2020). Often the results obtained during the analyzes are complex and require multivariate techniques to assist in the interpretation of the data. In this sense, Principal Component Analysis (PCA) is a linear pattern recognition method capable of transforming a large number of complex original data into several main components (which are linear combinations of the original variables) and simplify the interpretation of the data through reduction of dimensionality (Sampaio et al., 2017; Teofilović et al., 2017).

There is little information in the literature about the proteolytic study and possibilities of applications in *Cynara scolymus* leaves extracts and none related to the protein profile. In this sense, the objective of this research was to obtain the extracts from the leaves of the artichoke (*Cynara scolymus*) in different buffers and methods as an alternative proteolytic source and plant coagulant, as well as the separation and comparison of the protein profile of the extracts by High-performance Liquid Chromatography.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Material and location of the research

The artichoke (*Cynara scolymus*) leaves were acquired from the city of São Paulo-SP, Brazil, located in the coordinates of Latitude 23° 32' 56" S and Longitude 46° 38' 20" W, in August and September 2020. Cow's milk in local commerce in the city of Itapetinga-BA, Brazil (Latitude 15° 15' 23" S and Longitude 40° 15' 27" W). All reagents used were from analytical grade and without further purification. Sodium citrate (CAS: 6858-44-2) was acquired from the exodus brand; Sodium acetate (CAS: 6131-90-4) from the Vetec brand, trichloroacetic acid (CAS: 76-03-9) from Synth; Tris-HCl (CAS: 1185-53-1), bovine serum albumin (CAS: 9048-46-8), tyrosine (CAS: 60-18-4) and Coomassie bright blue G-250 (CAS: 6104-58 - 1), casein (CAS: 9000-71-9) acquired from Sigma-Aldrich Brasil. The experiments were performed at the State University of Southwest Bahia (UESB), campus of Itapetinga, Bahia, Brazil, at the Laboratory of Process Engineering (LPE).

2.2. Extracts of artichoke leaves

The crude extracts of vegetable protein were obtained following the methodology of Esposito et al. (2016), with modifications. Initially, the leaves (1: 5 m/v) went through a pre-treatment where they were incubated in a Shaker incubator (SL 222) (200 rpm, 37 °C and 20 min) in 0.1 M/pH 5 sodium acetate buffer, with 13% (w/v) sorbitol. Then, the leaves (1:3 m/v) passed through the mechanical stirring method (Tecnal-139) at maximum velocity for 3 min and digital ultrasonic (Soniclean 6) at 35 °C, frequency 40 kHz, for 60 min to assist in the extraction, with three different buffer: 0.1 M sodium citrate/pH 3.0, 0.1M sodium acetate/pH 5.0, 0.1M Tris-HCl/pH 7.0. After, the homogenates were filtered in fabric filter and centrifuged (SP-701) at 3248 x g for 20 min at 4 °C. The extracts obtained were stored at -20 °C until the analysis. The treatments were performed in triplicate.

2.3. Protein determination

The protein concentration was determined by the Bradford (1976) method using bovine serum albumin (BSA) as a reference standard for the calibration curve. The absorbances of the samples were measured in a scanning UV spectrophotometer (Model Q899UV2) at 595 nm.

2.4. Determination of proteolytic and specific activity

The proteolytic activity (PA) (Equation 1) of the artichoke leaves extracts was determined according to Llorente et al. (2014). Was added 200 μL of the crude extract was added in 1 mL of the 1% (w/v) casein solution in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.0. The reaction was carried out at 37 $^{\circ}\text{C}$ in a Tecnal thermostatic bath (Model TE-2005) for 10 min and interrupted by the addition of 1 mL of 10% trichloroacetic acid (w/v) and maintained for 20 min in an ice bath. Subsequently, it was centrifuged (SP-701) at 3248 x g for 20 min and the supernatant was collected and its absorbance was read at 280 nm in a scanning UV spectrophotometer (Model Q899UV2). Unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme needed to produce 1.0 $\mu\text{mol/mL}$ of tyrosine per min.

$$PA \left(\frac{U}{mL} \right) = \text{Tyrosine} \left(\frac{\mu\text{mol}}{mL} \right) \times \left(\frac{\text{Dilution factor}}{\text{Enzyme Volume}} \right) \times \left(\frac{\text{Total Volume}}{\text{Incubation time}} \right) \quad (1)$$

The specific enzymatic activity (SEA) was obtained from the ratio between proteolytic activity and protein concentration (Equation 2).

$$SEA \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{\text{proteolytic activity}}{\text{Protein}} \quad (2)$$

2.5. Milk clotting activity and rennet replacement potential

The milk clotting activity (MCA) (Equation 3) of the artichoke leaves extracts and of Microbial Chymosin (*Aspergillus niger var. awamori*, HA-LA) was determined by the method described by Arima et al. (1971), with modifications. Cow's milk (5 mL) was used as a substrate and incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min in a Tecnal thermostatic bath (Model TE-2005), then 500 μL of crude extract was added. The mixture was kept at 37 $^{\circ}\text{C}$ until the formation of a visible solid curd, maximum coagulation time of 1 hour. The amount of enzyme that coagulated the substrate in 1 min was defined as 400 units.

$$MCA \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{2400}{\text{Clotting time (seg)}} \times \text{Dilution factor} \quad (3)$$

The rennet substitution potential (RSP) (Equation 4) was found by the ratio between milk coagulation activity and protein activity (Afsharnejhad; Shahangian; Sariri, 2019).

$$RSP = \frac{\textit{Coagulation activity}}{\textit{Proteolytic activity}} \quad (4)$$

2.6. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) of artichoke leaves extracts

For the preparation of the samples, the pure extracts of the artichoke leaves were collected and filtered through a 0.44 mm syringe filter. The methodology used was described by Ong, Henriksson and Shah (2007) with modifications. The samples were subjected to reverse phase liquid chromatography (RP-HPLC) using a C18 column (250x4.6 mm internal diameter, 5 mm particle size; ZORBAX Eclipse Plus C18), attached to a pre-column (ZORBAX SB-C 18, 4.6 mm ID x 12.5 mm, 5 μ m, connected to the system HP Agilent 1260 Infinity II. Two mobile phases were used, the first (A) composed of an acetonitrile solution (5%, V/V) and trifluoroacetic acid (0.1%, V/V) and the second phase (B) formed by acetonitrile (50%, V/V) and trifluoroacetic acid (0.1%, V/V). A 20 μ L aliquot of the sample was automatically injected into the column at a flow rate of 1 mL/min as a gradient of the mobile phases A and B over 60 minutes. The analysis started with the 100% flow of mobile phase A and decreased linearly over 60 minutes until 100% of the flow was represented by phase B. The run temperature was maintained at 30 °C and the detection of proteins was performed at 280 nm by Visible Ultraviolet (UV-Vis) with Diode Array Detector (DAD). The protein profile was characterized according to the separation and resolution of the peaks by UV spectra.

2.7. Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of artichoke leaves extracts

The electrophoresis analysis (Model Vert-i10, loccus) in polyacrylamide gel under denaturant conditions (SDS-PAGE) was performed according to the methodology described by Laemmli (1970), with modifications. Extracts of artichoke leaves and denaturant were prepared in the 3:1 (m/v) proportion and boiled at 100 °C for 7 min, the separation gel with 12% concentration and stacking gel at 5% concentration. The molecular mass standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) were myosin (200.0 kDa), b-galactosidase (116.2 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45.0 kDa), carbonic anhydrase (31.0 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa), lysozyme (14.5 kDa, but apparent molecular mass of 15.5 kDa), and aprotinin (6.5 kDa). Electrophoresis was performed with 40 μ L of denatured sample per well, run with constant voltage equal to 100

V, for 180 min and temperature of 4 °C. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue, discolored and scanned.

2.8. Statistical analysis

The results of the analyzes were verified by analysis of variance (ANOVA) and submitted to the test of comparison of means by the Tukey Test, at a significance level of 5%. The statistical analysis was performed using Sisvar statistical software, version 5.6.

Principal Component Analysis (PCA) was applied to HPLC obtained chromatograms of artichoke leaves protein extracts to evaluate the influence of protein extraction methods (mechanical agitation and ultrasound) in order to identify similarities and/or differences in protein profile. In the PCA, the variables used were the maximum absorbance values of the chromatogram peaks and were characterized as vectors. The data were standardized to eliminate the differences between the measurements of the variables to be studied, obtaining a new variable (Z) with mean equal to zero and standard deviation equal to one (Equation 5):

$$Z = (X - \mu) / \sigma \quad (5)$$

Z = standardized variable; X = original variable; μ = Average e σ = standard deviation

From the standardized data the variance and covariance matrix was obtained, which was factored into a diagonal matrix (Santos et al., 2020). The number of main components (CP) was chosen by assessing the cumulative variance which considers the sum of eigenvalues greater than 70%. The scatter plot of the correlation coefficients between the variables and the PCs was plotted to verify the formation of clusters with similar samples. The variables that showed a low correlation ($p > 0.05$) with the main components were discarded. The Statistical Analysis Syste (SAS) software, Student version and Sigma Plot 11.0 were used.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Proteins, proteolytic and specific activity of artichoke leaves extracts

Protein extraction from plant sources is normally performed out from flowers, seeds, roots, rhizomes and leaves, through different aqueous solutions and procedures of maceration and homogenization. The results of protein analysis, proteolytic and specific activity carried out on extracts of artichoke leaves are shown in Table 1.

Tabla 1. Mean protein values, proteolytic and specific activity of the extracts obtained from the artichoke (*Cynara scolymus*) leaves by the mechanical stirrer and ultrasonic method.

Extracts	Mechanical stirrer	Ultrasonic
	Proteins (mg/mL)	
Citrate	1.39 ^{aA} ± 0.16	0.73 ^{aB} ± 0.07
Acetate	1.31 ^{aA} ± 0.14	1.33 ^{bA} ± 0.02
Tris	1.33 ^{aB} ± 0.01	1.42 ^{bA} ± 0.03
	Proteolytic activity (U/mL)	
Citrate	13.22 ^{aB} ± 0.15	14.38 ^{aA} ± 0.11
Acetate	7.98 ^{bB} ± 0.11	13.04 ^{bA} ± 0.21
Tris	8.83 ^{bA} ± 0.68	9.27 ^{cA} ± 0.10
	Specific activity (U/mg)	
Citrate	9.59 ^{aB} ± 1.33	19.71 ^{aA} ± 1.64
Acetate	6.12 ^{bB} ± 0.61	9.76 ^{bA} ± 0.21
Tris	6.63 ^{bA} ± 0.51	6.53 ^{cA} ± 0.13

Different lower-case letters in the same columns indicate that they differed between buffers. Different capital letters on the same lines indicate that they differed between methods using the Tukey test to 5% probability. Mean ± standard deviation.

The protein content found in the artichoke leaves extracts did not present a statistically significant difference ($p \geq 0.05$) between the buffers used for the method with a mechanical stirrer. However, for the ultrasonic method there was a difference ($p \leq 0.05$) of the extract with sodium citrate in relation to the other buffers and lower protein content. It was found that among the methods only the extracts with sodium acetate obtained similar values. Thus, the crude extracts with the best experimental results for proteins among the evaluated methods were Citrate-MS (pH 3.0), sodium acetate (pH 5.0) with both methods, and Tris-US (pH 7), respectively.

The greater predominance of proteolytic and specific activity was found in the Citrate-US samples in relation to the other buffers. The extracts with Tris-HCl had lower results for these parameters in the ultrasonic method. It can be observed that there was no significant difference ($p \geq 0.05$) between the samples with sodium acetate and Tris-HCl in the method with mechanical stirrer. The value for specific activity may be related to the mixture of various proteins in addition to proteases in plant extracts and its increase may be due to the degree of purity of the enzyme (Gutiérrez-Méndez et al., 2019).

Results close to the study were verified in the work of Muthu et al. (2017) for proteins quantification (0.23 mg/mL to 1.55 mg/mL) in extracts from 20 leaves of different plant species. They also reported that extracts from *Wrightia tinctoria* leaves obtained with the sodium acetate (pH 5.0 and 5.5) and Tris-HCl (7.5) buffers showed the best responses for proteolytic activity. Lomolino, Zannoni and Pierro (2015) evaluated the commercial extract of the *Cynara cardunculus* L. plant of the same family (Asteraceae) as the artichoke leaves and quantified the protein content (0.103 ± 23 mg/mL). Chávez-Garay et al. (2016) studied the protein content of the extracts with sodium acetate buffer (pH 5.0) of the *Solanum elaeagnifolium* plant and obtained values for the fruits (1.55 mg/mL), peel (1.06 mg/mL) and seeds (1.59 mg/mL); and Gutiérrez-Méndez et al. (2019) found specific proteolytic activity 0.78 U/mg for the same plant extract.

Results of the characterization of extracts from the artichoke flowers were demonstrated by Gomes et al. (2019) when studying extracts of 15 *Cynara cardunculus* L. flowers with proteolytic activity ranging from 4.10 to 5.28% and 3.63 to 5.07%. Lower values of the analyzes with extracts of the artichoke leaves were demonstrated by Llorente, Brutti and Caffini (2004) when determining the protein content (0.34, 0.28 and 0.13 mg/mL) and proteolytic activities (0.50, 2.39 and 1.10 U/mg) of the raw extracts of the artichoke leaves with use of electric mixer. Bueno-Gavilá et al. (2020) described that the proteolytic activity of the artichoke flower extracts was influenced by the buffer used, with greater activity (62%) in sodium citrate at pH 5.0.

In general, the parameters evaluated in this study with extracts of artichoke (*Cynara scolymus*) leaves obtained good results with the use of pretreatment, together with sodium citrate pH 3.0, sodium acetate pH 5.0 and Tris-HCl pH 7.0 buffers and mechanical stirring and ultrasonic methods. The pretreatment aided in the rupture of the rigid cell wall of cellulose, hemicelluloses, lignin and complex polysaccharides, even without the addition of viscosima as previously reported by Esposito et al. (2016). The extraction was based on the work of Esposito et al. (2016) with artichoke leaves extracts using a different method (ultra-

turrax). The extract with Citrate-US obtained better experimental result that can be related to most aspartic proteases that are activated at acidic pH during the cheese making process for example (Llorente et al., 2014).

3.2. Coagulation activity and rennet substitution potential of artichoke leaves extracts

Vegetables contain a wide variety of proteins in their tissues because of their properties and functions. Factors such as temperature, pH and the type of protease present in crude vegetable extracts affect the determination of milk clotting activity (Mazorra-Manzano et al., 2013) and consequently its potential for replacing rennet. The results of milk clotting activity (MCA) and rennet substitution potential (RSP) of the artichoke (*Cynara scolymus*) leaves extracts are shown in Table 2.

Tabela 2. Coagulation activity of artichoke leaf extracts (*Cynara scolymus*) in cow's milk and its rennet potential for curd replacement.

Extracts	Mechanical stirrer			Ultrasonic		
	Time (seg)	MCA (U/mL)	MCA/P A	Time (seg)	MCA (U/mL)	MCA/P A
Citrate	174	151.72 ^{ab} ± 0.00	11.48	60	440.00 ^{aA} ± 0.00	30.60
Acetate	180	146.67 ^{ab} ± 0.00	18.38	180	146.67 ^{bB} ± 0.00	11.25
Tris	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Coagulant	Time (seg)	MCA (U/mL)		MCA/PA		
Chymosin	37	713.51 ^{bc} ± 0.00		38.25		

Different lower case letters in the same columns indicate that they differed between buffers and chymosin. Different capital letters on the same lines indicate that they differed between methods using the Tukey test to 5% probability. Mean ± standard deviation. NS: Milk clotting activity not specified.

It can be observed that the extract of the artichoke leaves with sodium citrate (pH 3.0) in the ultrasonic method exhibited the best effect in the MCA, a measure of concentration of enzymes for coagulation and an important parameter in the production of cheeses, with maximum duration of 1 min. The other extracts obtained with citrate and acetate had similar results for MCA due to the coagulation time being close and although the values were lower than the extract with Citrate-US the coagulation was obtained in a

period considered fast. The extracts performed with Tris-HCl were not coagulated in the maximum period studied (1 hour).

According to Llorente et al. (2014) and Amira et al. (2017) the vegetable enzymes for milk coagulation that are generally used belong to the class of aspartic proteases (as from example the artichoke), that are successful in causing specific hydrolysis at the Phe105-Met106 bond of the κ -casein C-terminal, and the vast majority of these proteases are activated at acidic pH. With the results found in the study it also be seen that the methods used for the production of the extracts directly influenced the extraction of coagulant enzymes together with the chosen buffer.

The extract with Citrate-US obtained the highest RSP among other buffers and methods, followed by the extract with Acetate-MS. The substitution potential of vegetable rennet is an important parameter in the possibility of proteases to form curd and replace animal rennet. The high milk coagulation capacity and relatively low proteolytic activity attribute the enzyme to a high ratio between MCA and PA. The higher the RSP value, the better the use of the coagulant for cheese production, since the coagulation time is short and the volume of coagulant required is low (Horne; Banks, 2004; Yadav; Patel; Jagannadham, 2012; Gutiérrez-Méndez et al., 2019).

Commercial chymosine MCA was performed as a comparison parameter with the extracts studied from the artichoke leaf and also PA to obtain the RSP result. Chymosin presented PA of 25.15 ± 0.031 U/mL and significant difference for MCA and RSP in relation to the extracts. Even so, the coagulation time of the treatments that coagulated did not exceed 3 min. Chymosin has been considered the most efficient coagulant due to the higher value for MCA and pepsin as an adequate alternative, even with lower values. These two enzymes of animal origin were identified in the work of Afsharnezhad, Shahangian and Sariri (2019) with results for MCA and RSP of chymosin of 81 U/mL and 522.58 and pepsin 53 U/mL and 19.13. The values presented for MCA were lower than the study with extracts of artichoke leaves by different treatments. The chymosin RSP was superior to extracts and pepsin close to the study.

3.3. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

The chromatographic conditions used by the HPLC method proved to be suitable for separating the different compounds present in the artichoke leaves extracts (Figure 1). The profiles of the extracts were obtained in order to evaluate the effect of the variables (buffers and extraction methods) before the compounds present in the extracts.

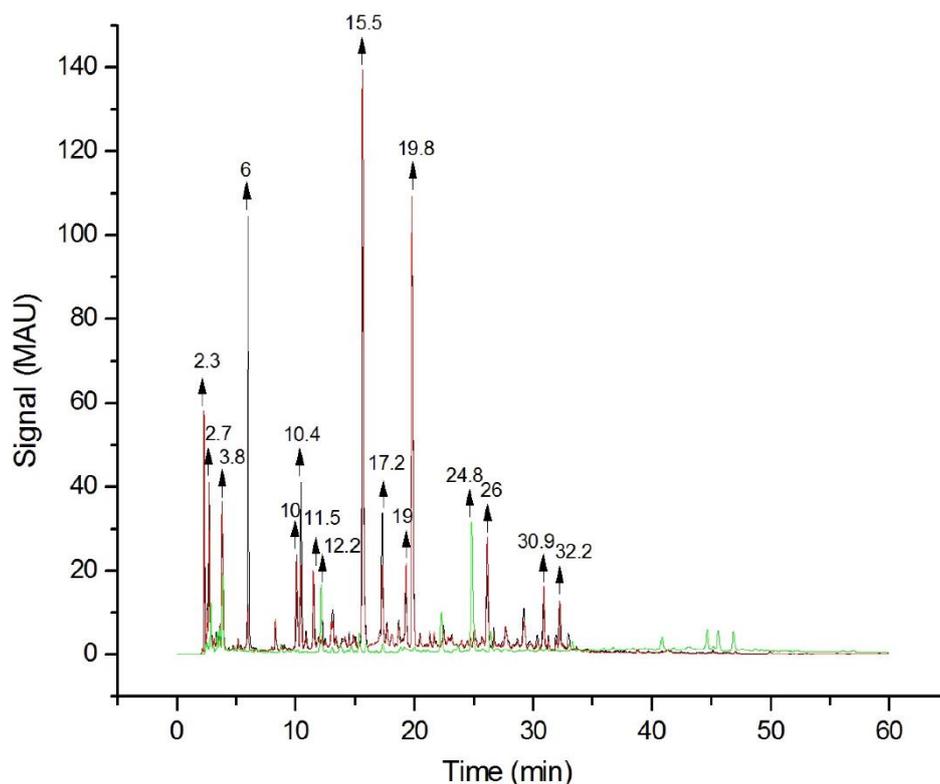


Figure 1. HPLC chromatogram of protein extracts from artichoke leaves using the mechanical stirring method. Citrate-MS (black), Acetate-MS (red) and Tris-MS (green).

The effects of treatments on the elution profiles were marked by chromatographic peaks at 0 to 50 min. The spectra showed that the areas of the chromatograms for the extracts obtained with Citrate-MS and Acetate-MS buffers showed better sensitivity and more predominant peaks. This result reveals that some biomolecules were extracted more efficiently at acidic pH. According to Yegin and Dekker, (2013) some proteins have residues of aspartic acid in their active sites that can be optimally activated at acidic pH, which possibly may have favored the extraction of these compounds.

According to the retention times and UV spectra of the main peaks of the chromatograms, similarities were observed between the compounds found in the extracts with Citrate-MS, Acetate-MS and Tris-MS in the interval between 2 to 4 min, with difference in peak intensity. The extract with Acetate-MS was particularly the buffer that showed the highest peak intensity ranging from 36 to 58 mAU, compared to the other extracts with Citrate-MS (28 to 37 mAU) and Tris-MS (12 to 19.5 mAU). Srivastava et al. (2009) identified the presence of alkaline protease activity from spinach leaves by HPLC at 280 nm with less intense peaks in 2 to 4 min and predominantly in 7 to 9 min. It is important

to note that the observed peaks can vary, as they are easily affected by experimental extraction parameters, type of sample, origin and plant conditions (Lombardo et al., 2010).

An individual peak with high intensity (104 mAU) was detected only for the extract with Citrate-MS buffer in the elution time of 6 min, possibly due to the presence of some compound that was not identified in the other extracts. Another particular peak was identified by the extract with buffer Acetate-MS in time (11.50 min) relatively short and intensity 20.73 mAU, indicates that the affinity for the hydrophobic stationary phase is low and therefore the compound has a hydrophilic character. From this, the relationship of this hydrophobicity is possible to characterize it with the presence of amino acids, such as glutamic acid (Afsharnezhad; Shahangian; Sariri 2019).

The analysis identified other relevant peaks in fractions eluted at retention times of approximately 10, 15, 17, 19 and 26 min similar for the extracts with the Citrate-MS buffer (40.76; 97.40; 34.39; 107.54 and 19.10) mAU and Acetate-MS (28.85; 139.72; 21.61; 109.30 and 27.83) mAU, respectively. For the extract with Tris-MS, only the times in 15.5 and 26 min showed signs of presence of compounds, however with low intensity peaks compared to the other extracts (5.26 and 5.58 mAU). However, the Tris-MS extract showed an individual peak in 24 min (31.7 mAU). After that time, the extract with Acetate-MS buffer showed an elution profile in 30 min (16.39 mAU) and 32 min (13.27 mAU). Veríssimo et al. (1996) characterized aspartic proteinases in fresh flower extracts from *Cynara cardunculus L.* and was able to identify peaks of polypeptide chains constituting cardosin-A in 25 to 30 min and cardosin-B in 23 to 30 min using the same method (RP-HPLC) and column (C18) and gradient used of 20-80% acetonitrile in 40 min.

The characterization of proteins in plant extracts by the RP-HPLC method under conditions similar to those of the study was discussed by some authors to evaluate the efficiency of the purification of proteases (Wang et al., 2020). According to the authors some factors such as the properties of the mobile phase can affect the activity of the protease, however, in these conditions evaluated it was possible to show the effectiveness of the method and to identify peaks related to milk-clotting proteases, which were consistent with SDS-PAGE results.

The chromatographic profile in HPLC obtained by reading samples of artichoke leaves extracts extracted with different buffers and by the ultrasonic method is shown in Figure 2. The extracts maintained a well-distributed profile during the analysis, identified by peaks with a variety of compounds.

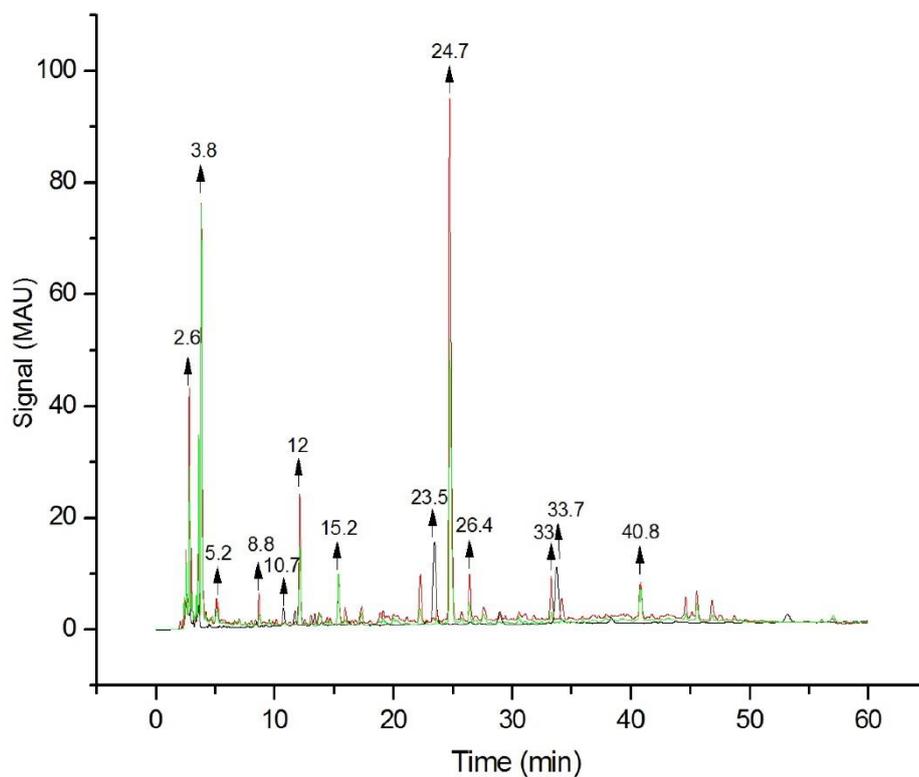


Figure 2. HPLC chromatogram of extracts of protein from artichoke leaves using the ultrasound method. Citrate-US (black), Acetate-US (red) and Tris-US (green).

According to Figure 2, the elution profile for the ultrasound method revealed bands in the first moments of analysis (0-5 min). The extraction method favored the peak intensity in this time interval for the Tris-US extract, with intensity ranging from 12 to 76 mAU compared to that found in mechanical stirring. However, the compounds possibly separated in the same time interval showed to be more sensitive to the action of the extract with Acetate-US (42 to 76 mAU) and peaks with less intensity for the Citrate-US buffer (6 to 7 mAU). The extract with Acetate-US buffer identified a particular peak in the elution time of 8.8 min. It also presented other individual peaks for this method compared to Citrate-US and Tris-US at the retention times of 26.4 min (10.45 mAU) and 33 min (10 mAU), similar to the compounds that were separated in the same time range with the mechanical stirrer method.

The extract with Citrate-US buffer showed isolated peaks in 10.7; 23.5 and 33.7 min that represent compounds that were not detected for the other extracts. The results revealed similar peaks for extracts with Acetate-US and Tris-US buffers in 12, 15, 24.7 and 40.8 min,

however Acetate-US detected peaks with greater intensities. The elution time of 24.7 min of the Tris-US extract showed higher intensity (52.04 mAU) than the extract with Tris-MS (31.7 mAU). As shown by Veríssimo et al. (1995) these peaks have the potential to indicate the presence of active enzymes of aspartic proteases (cardosins A and B) that may be related to the results found for proteolytic activity in the studied extracts, since these enzymes have proteolytic action on caseins being the its activity similar to animal rennet.

A study of the chromatographic profile of the leaf extract of *Cynara scolymus*.L. by RP-HPLC showed similarities with the UV spectra in some of the peaks highlighted in the present study (Souza et al., 2018). The applied extraction methods may have influenced for a better resolution of the peaks of the compounds present in the extracts due to the good selectivity presented in the analyzed chromatograms.

With the results of the chromatographic evaluation (HPLC) of the protein extracts of the artichoke leaves it was possible to compare the protein profile of various proteins. Most of the signal intensities observed in the extract chromatograms revealed that the more acidic buffers in the pH range may have favored the presence of these compounds, regardless of the extraction procedure, but the peak intensities by the mechanical stirring method were more intense.

3.4. Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of artichoke leaves extracts

To verify the presence of proteins in the artichoke leaves extracts with different extraction methods and buffers, electrophoresis analysis was performed, as shown in Figure 3. The molecular marker bands used as standard were from 6.5 to 200 kDa. It can be verified that the extracts with Acetate and Tris-HCl presented greater predominance of proteins with molecular mass around 21.5 kDa and 31 kDa; and other two weaker bands between 6.5 kDa and 15.5 kDa. The extract of Citrate-MS showed the presence of proteins between 15.5 kDa to 21.5 kDa and below 31 kDa. All the extracts obtained proteins of molecular mass of 200 kDa. The protein bands with better visibility in the electrophoresis analysis of artichoke leaves extracts are directly related to the peaks of greater intensity in the chromatography (Figures 1 and 2).

Studies in the literature have proven the presence of proteins in plants of the family Asterales. Ordiales et al. (2016) have studied the protein profile of *Cynara cardunculus* L. extracts and found intense bands in 16.7 and 30.2 kDa and 13.5 and 32 kDa that could

indicate cardosin A and cardosin B, respectively. Llorente et al. (2004) performed the purification of *Cynara Scolymus* aspartic protease, identified the 31 kDa molar mass as cardosin and confirmed it in mass spectrometry. According to Veríssimo et al. (1996) cardosin A and B was distinguished by means of relative mobility in SDS-PAGE gels. Both are heterodimeric, being composed of two dissimilar polypeptide subunits, with molecular masses of 31 and 15 kDa and 34 and 14 kDa, respectively. Amira et al. (2017) evaluated the electrophoretic profile (SDS-PAGE) of the raw extracts of the thistle flowers (*Cynara cardunculus* L.) and determined that the intensity of the protein band 30 kDa is related to milk coagulation.

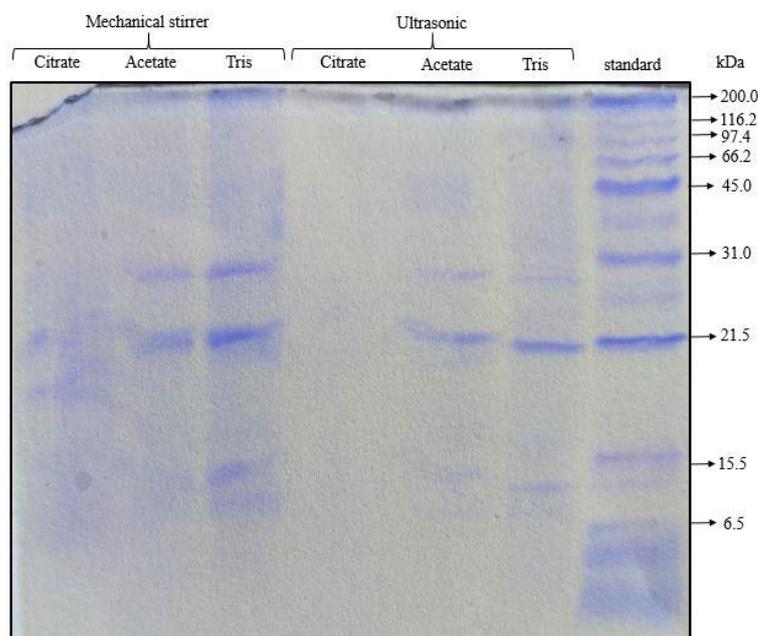


Figura 3. Electrophoretic profile (SDS-PAGE) of the artichoke leaves extracts, (1) Citrate-AM; (2) Acetate-AM; (3) Tris-AM; (4) Citrate-US; (5) Acetate-US; (6) Tris-US. (P) molecular protein marker (6.5 to 200 kDa).

3.5. Principal Component Analysis (PCA)

Principal Component Analysis (PCA) was applied to chromatograms of protein extracts obtained by HPLC in order to evaluate the influence of extraction methods (mechanical stirring and ultrasound) on sample separation. The differences observed in relation to the intensities and varieties of the peaks indicate the presence of many protein compounds in extracts. The PCA allowed us to evaluate the set of variables (protein-related absorbance values) responsible for grouping samples. The absorbance data (19 peaks) were collected, standardized and submitted to analysis. After discarding the non-significant

variables, ten peaks were analyzed and the percentage of explanation of the main components was increased.

The variability of the data was explained by two main components that were responsible for 93.47% of the total variation, indicating that the observed peaks allowed to satisfactorily separate the samples based on their similarities and/or differences. Principal component I (PC1) explained 70.09% of the data variation and showed a significant correlation ($p < 0.05$) with seven of the ten variables (peaks) observed represented by the retention times (in minutes): 2.3; 10.5; 15.5; 17; 19; 26 and 30. Principal component II (PC2) was responsible for 23.38% and correlated with three other variables (3.7; 11.5 and 23.5 min). The latter components were associated with a smaller portion of the available variance. According to Teofilović et al. (2017), the main components are chosen so that (PC1) accounts for the greatest variability of the data, followed by PC2 and so on.

When analyzing Figure 4, we observe a group of samples located to the right of PC1 (positive part of the graph) related to the protein extracts obtained by mechanical stirring (MS) and another group to the left of PC1 (negative part of the graph), associated to extracts obtained by ultrasound (US). The extracts obtained from Tris-MS showed different dispersion behavior.

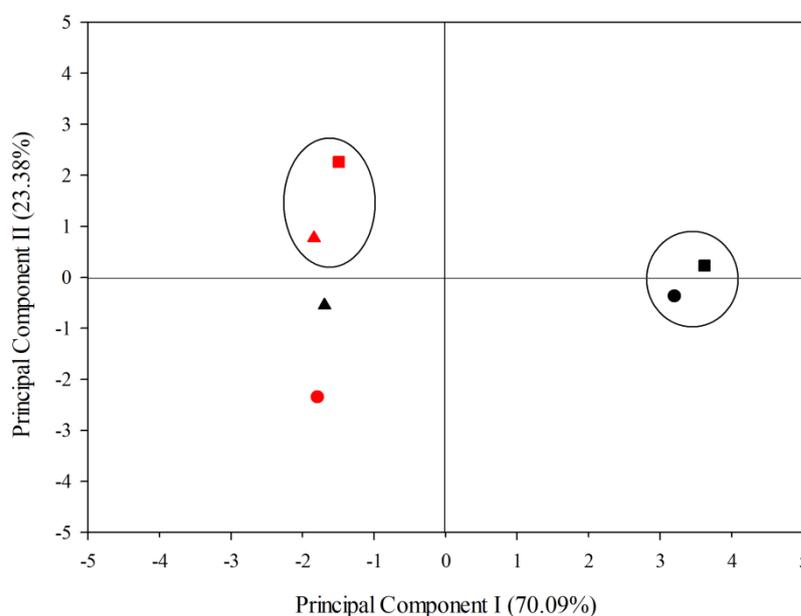


Figura 4. Scatter plot of Principal Components 1 and 2 of protein extracts from Artichoke leaves by the method of mechanical stirring and ultrasound according to the data obtained by HPLC. Black symbols: Mechanical extraction; Red symbols: Extraction by ultrasound. The distinct geometry of the symbols represents the different plugs used in the extraction.

● Citrate-MS, ■ Acetate-MS, ▲ Tris-MS, ● Citrate-US, ■ Acetate-US and ▲ Tris-US.

The method of mechanical stirring (MS) allowed to observe that the treatments (Citrate-MS and Acetate-MS) showed similarities in relation to the proteins found in the extracts, being grouped in the positive part of CP1. This indicates higher amount of protein compounds extracted compared to samples with negative CP1 values. When using this method, the peaks (10.5; 15.5; 19; 26 minutes) were identified in the extracts Citrate-MS and Acetate-MS representing descriptors of importance correlated with CP1. The Tris-MS extract was located on the negative side of CP1 and CP2 for presenting peaks with lower intensities in the HPLC analysis, which can be associated with the characteristics of the buffer and its interactions with the molecules when using the mechanical stirrer showing reduction or absence of protein compounds associated with CP1 and grouping close to ultrasound treatments. The study also showed lower results for Tris-MS in relation to protein content, in addition to not showing milk clotting activity.

The graph (PCA) showed that the protein extracts obtained by ultrasound were grouped to the left of PC1. It is observed that the main component II (CP2) was responsible for the separation of data, and the variables (3.7; 11.5 and 23.5 min) being positively correlated with CP2. The results of the chromatography for the ultrasound method allowed to observe that during the first five minutes of analysis, the extracts (Acetate-US and Tris-US) showed peaks with high intensity, whereas Citrate-US provided less intense peaks. Other peaks (12, 15, 24 and 40 min) were also identified for Acetate-US and Tris-US, facilitating the grouping due to the similarities in the extract composition.

However, Citrate-US treatment showed isolated peaks at times of 11 and 23.5 minutes, representing proteins that were not detected in the other extracts. It is possible that these peaks are related to proteolytic activity, because when analyzing the graph it is observed that Citrate-US, although it did not present a higher protein content, obtained statistically superior results in relation to specific and proteolytic activity, which may be related the presence of the proteins of interest. The amount of protein compounds extracted by Citrate-US was lower, as it had a low concentration of the peaks associated with CP1. In

this sense, the distance between the samples may be related to differences in the composition of the extracts, displacing the Citrate-US to the negative side of CP2.

Among the buffers evaluated in the study, both citrate and acetate showed good results for milk coagulation capacity (MCA) and rennet substitution potential (RSP). In a study by Esposito et al. (2016), extracts of artichoke leaves and alpine thistle flowers were evaluated using the same extraction buffers at different pH. It was possible to extract two milk coagulation enzymes belonging to the aspartic protease family, where the Citrate buffer provided better yield with a pH value (5.0) similar to that used in the coagulation of milk during cheese processing. Among the methods evaluated in this study, ultrasound was the most suitable for obtaining proteases from extracts of artichoke leaves.

Chromatograms obtained using HPLC had a significant impact on sample separation. Some compounds were eluted in longer times (26 and 45 minutes) and the ultrasound method allowed to observe these peaks with higher intensity, which indicates the possible extraction of components with greater hydrophobicity due to the longer retention times. Balaraman and Rathnasamy (2019), when evaluating the factors that most influenced the extraction yield of proteases obtained by ultrasound, found that the analysis time and temperature stood out. Many factors can alter the protein extraction process, that is why it is important to optimize the extraction conditions in order to improve the characteristics of the desired product.

The PCA allowed the formation of groups of samples according to the extraction method used. In the mechanical stirring method, both Citrate-MS and Acetate-MS could be indicated to obtain protein extracts from artichoke leaves. However, according to the results of the analysis carried out in this study, the extract obtained with sodium citrate associated with the ultrasound presented relevant results and can be chosen for application in cheeses as a plant source coagulant.

4. CONCLUSION

It can be concluded that the extract of the artichoke leaves with Citrate-MS had lower proteins content and the Citratro-US the best responses in relation to other treatments for the parameters of proteolytic activity, specific, milk coagulation and rennet replacement potential. Thus, it can be indicated as a vegetable coagulant for application in cheese. The extracts with Tris-HCl at pH 7.0 did not show results for the coagulation parameters in the time established by the research.

The HPLC protein separation of the artichoke leaves extracts revealed different protein profiles between the buffers and extraction methods used. The peak resolutions were more expressive in the extracts obtained with Citrate-MS and Acetate-MS. The extract with Citrate-US buffer showed isolated peaks that represent different proteins in relation to other methods with US which may be related to the high power of MCA and RSP. Principal component analysis showed that artichoke leaves extracts can be separated according to the extraction method used due to differences in protein profile, in addition to checking the applicability of the HPLC technique for separating the components present in the extracts.

This research presents the potential of using the by-product (leaves) of artichoke as a new source of proteolytic plant coagulant studied in Brazil under different extraction methods. Another scientific novelty of this article is the protein chromatographic profile of extracts, the PCA applied to HPLC analysis in the field of plant proteases and the confirmation of proteins by electrophoresis. Thus, it is feasible to develop research with the purification of proteolytic enzymes from the leaves of the artichoke and application in the food area as a vegetable coagulant.

5. REFERENCE

- ABEBE, B.; EMIRE, S. Manufacture of fresh cheese using east African *Calotropis procera* leaves extract crude enzyme as milk coagulant. **Food Science and Nutrition**, 8(9):4831-4842, 2020.
- AFSHARNEZHAD, M.; SHAHANGIAN, S. S.; SARIRI, R. A novel milk-clotting cysteine protease from *Ficus johannis*: Purification and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, 121(1):173-182, 2019.
- AHMED, M. I. A.; 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 Science and Technology**, 43(5):759-764, 2010.
- ALMEIDA, C. M.; SIMÕES, I. Cardoon-based rennets for cheese production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 102(11):4675-4686, 2018.
- AMIRA, B. A. et al. Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. **International Journal of Food Properties**, 20(1):S7-S93, 2017.
- ARIMA, K. et al. Milk-clotting enzyme from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, 35(9):1398-1401, 1971.
- BALARAMAN, H. B.; RATHNASAMY, S. K. Selective purification of protease from ginger and sodom apple by ultrasound assisted liquid-liquid microextraction using natural deep eutectic solvent. **Microchemical Journal**, 150:e104132, 2019.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72(1-2):248-254, 1976.
- BUENO-GAVILÁ, E. et al. Characterization of proteolytic activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) flower extracts on bovine casein to obtain bioactive peptides. **Animals**, 10(5):1-11, 2020.
- CHÁVEZ-GARAY, D. R. et al. Partial characterization of a plant coagulant obtained from the berries of *Solanum elaeagnifolium*. **CYTA - Journal of Food**, 14(2):200-205, 2016.
- COSKUN, O. Separation techniques: Chromatography. **Northern Clinics of Istanbul**, 3(2):156-160, 2016.

- ESPOSITO, M. et al. Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease. **Food Chemistry**, 204:115-121, 2016.
- FALCO, B. et al. Artichoke: Botanical, agronomical, phytochemical, and pharmacological overview. **Phytochemistry Reviews**, 14(6):993-1018, 2015.
- FERNÁNDEZ-LUCAS, J.; CASTAÑEDA, D.; HORMIGO, D. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. **Trends in Food Science and Technology**, 68(10):91-101, 2017.
- GOMES, S. et al. Characterization of *Cynara cardunculus* L. flower from Alentejo as a coagulant agent for cheesemaking. **International Dairy Journal**, 91:178-184, 2019.
- GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, N. et al. Proteolysis and rheological properties of cream cheese made with a plant-derived coagulant from *Solanum elaeagnifolium*. **Foods**, 8(2):44, 2019.
- HORNE, D. S.; BANKS, J. M. Rennet-induced coagulation of milk. In: McSWEENEY, P. L. et al. **Cheese Chemistry, Physics and Microbiology**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Applied Science, v.1, p. 47–70, 2004.
- KUMARI, M.; SHARMA, A.; JAGANNADHAM, M. V. Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. **Food Chemistry**, 131(4):1295-1303, 2012.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-685, 1970.
- LATTANZIO, V. et al. Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. **Journal of Functional Foods**, 1(2):131-144, 2009.
- LIU, S. et al. Recent advances on protein separation and purification methods. **Advances in Colloid and Interface Science**, 284:e102254, 2020.
- LLORENTE, B. E. et al. Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases. **Food Chemistry**, 159:55-63, 2014.
- LLORENTE, B. E.; BRUTTI, C. B.; CAFFINI, N. O. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52(26):8182-8189, 2004.

- LOMBARDO, S. et al. Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori]. **Food Chemistry**, 119(3):1175-1181, 2010.
- LOMOLINO, G.; ZANNONI, S.; PIERRO, G. D. Characterization of crude esterase activity from two plants used in cheese making: *Cynara cardunculus* L. and *Ficus carica* L. **Food Biotechnology**, 29(4):1532-4249, 2015.
- MAZORRA-MANZANO, M. A. et al. Sour orange *Citrus aurantium* L. flowers: A new vegetable source of milk-clotting proteases. **LWT - Food Science and Technology**, 54(2):325-330, 2013.
- MAZZEO, G. et al. Insect pollinators improve seed production in globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*). **Annals of Applied Biology**, 176(3):241-248, 2020.
- MUTHU, S. et al. Antibacterial serine protease from *Wrightia tinctoria*: Purification and characterization. **Plant Physiology and Biochemistry**, 112:161-172, 2017.
- ONG, L.; ENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Original article angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. **Dairy Science and Technology**, 87(2):149-165, 2007.
- ORDIALES, E. et al. Characterisation of the vegetable rennets used for 'Torta del Casar' cheesemaking by a protein profile method. **The International Journal of Dairy Technology**, 69(2):272-281, 2016.
- SAMPAIO, P. et al. Dataset of near-infrared spectroscopy measurement for amylose determination using PLS algorithms. **Data in Brief**, 15:389-396, 2017.
- SANTOS, M. P. F. et al. New insight about the relationship between the main characteristics of precursor materials and activated carbon properties using multivariate analysis. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, 98(7):1501-1511, 2020.
- SHAH, M. A.; MIR, S. A.; PARAY, M. A. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheese making: A review. **Dairy Science and Technology**, 94(1):5-16, 2014.
- SOUZA, O. A. et al. Fingerprinting *Cynara scolymus* L. (Artichoke) by means of a green statistically developed HPLC-PAD method. **Food Analytical Methods**, 11:1977-1985, 2018.
- SRIVASTAVA, A. K. et al. Purification and characterization of a salinity induced alkaline protease from isolated spinach chloroplasts. **Acta Physiologiae Plantarum**, 31(1):187-197, 2009.

- SUN, Q. et al. Comparative analysis on the distribution of protease activities among fruits and vegetable resources. **Food Chemistry**, 213:708-713, 2016.
- TEOFILOVIĆ, B. et al. Experimental and chemometric study of antioxidant capacity of basil (*Ocimum basilicum*) extracts. **Industrial Crops and Products**, 100:176-182, 2017.
- VERÍSSIMO, P. et al. Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. **European Journal of Biochemistry**, 235(3):762-768, 1996.
- VERÍSSIMO, P. et al. The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. **Biotechnology Letters**, 17(6):621-626, 1995.
- WANG, X. et al. Label-free quantitative proteomic analysis of the biological functions of *Moringa oleifera* seed proteins provides insights regarding the milk-clotting proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, 144:325-333, 2020.
- YADAV, R. P.; PATEL, A. K.; JAGANNADHAM, M. V. Neriifolin S, a dimeric serine protease from *Euphorbia nerifolia* Linn.: Purification and biochemical characterisation. **Food Chemistry**, 132(3):1296-1304, 2012.
- YEGIN, S.; DEKKER, P. Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: Structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. **Dairy Science and Technology**, 93(6):565-594, 2013.

**PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES DAS FOLHAS DA ALCACHOFRA
USANDO PARTIÇÃO EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

RESUMO

Os Sistema Aquosos Bifásicos (SAB's) são considerados uma alternativa promissora de extração e purificação de biomoléculas baseada nos princípios da química verde, constituídos majoritariamente por água, com ambiente operacional suave, processo rápido e versátil. O objetivo desta pesquisa foi realizar a purificação parcial de extrato de proteases das folhas da alcachofra por meio do SAB. O extrato proteico foi obtido a partir da extração com tampão acetato de sódio 0,1 M/pH 5,0 em banho ultrassônico digital. Os SAB's foram formados por diferentes concentrações de polietileno glicol (PEG) 1500 g.mol⁻¹, sal fosfato de sódio, diferentes pH, água e extrato, em temperatura a 25°C. Foi realizado um planejamento fatorial 2³ completo e análise de regressão múltipla. As variáveis respostas foram o coeficiente de partição da proteína (K_p) e da atividade enzimática (K_e), seletividade (S), fator de purificação (FP), índice de recuperação teórica (Y) e energia livre de transferência de Gibbs (Δ_tG). O perfil proteico foi verificado com a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a massa molecular com a Cromatografia de Exclusão Molecular (CEM). Em todos os sistemas as proteases tiveram preferência pela fase superior (K_e>1), rica em PEG. O sistema com concentração de PEG 10,5% e sal 9% em pH 8 demonstrou os valores mais elevados para K_e (10,603) e Y (89,454%). Os modelos matemáticos foram adequados para descrever o comportamento das variáveis dependentes. Com a CLAE do sistema selecionado foi possível visualizar os picos principais na fase superior no tempo de retenção 2,4 min (36,6 mAU) e 2,9 min (29,6 mAU), e na fase inferior em 2,4 min (47,4 mAU) e 2,7 min (40,0 mAU). Na análise de CEM para o extrato e as fases do sistema foram determinadas massas molares entre 17 kDa a 70,5 kDa. Conclui-se que, os SAB's estudados formaram fases e demonstraram potencial para purificação parcial das proteases extraídas das folhas da alcachofra.

Palavras-chave: Enzimas proteolíticas, *Cynara scolymus*, Sistemas Aquosos Bifásicos verdes.

ABSTRACT

Aqueous Two-phase Systems (ATP'S) are considered a promising alternative for the extraction and purification of biomolecules based on the principles of green chemistry, consisting mainly of water, with smooth operating environment, a fast and versatile process. The objective of this research was to carry out the partial purification of protease extract from artichoke leaves using SAB. The protein extract was obtained from extraction with sodium acetate buffer 0.1 M/pH 5.0 in a digital ultrasonic bath. The ATP'S were formed by polyethylene glycol (PEG) 1500 g.mol⁻¹, sodium phosphate salt, different pH, water and extract, at a temperature of 25°C. A complete 2³ factorial design and multiple regression analysis were performed. The response variables were the protein partition coefficient (K_p) and enzymatic activity (K_e), selectivity (S), purification factor (FP), theoretical recovery index (Y) and Gibbs transfer free energy (Δ_tG). The protein profile was verified with high performance liquid chromatography (HPLC) and the molecular mass with size-exclusion chromatography (SEC). In all systems the proteases had preference for the upper phase (K_e>1), rich in PEG. The system with concentration of PEG 10.5% and salt 9% at pH 8 demonstrated the highest values for K_e (10.603) and Y (89.454%). The mathematical models were adequate to describe the behavior of the dependent variables. With the HPLC of the selected system, it was possible to visualize the main peaks in the upper phase at retention times of 2.4 min (36.6 mAU) and 2.9 min (29.6 mAU), and in the lower phase at 2.4 min (47.4 mAU) and 2.7 min (40.0 mAU). In the analysis of SEC for the extract and the phases of the system, molar masses between 17 kDa and 70.5 kDa were determined. It is concluded that the ATP'S studied formed phases and demonstrated potential for partial purification of proteases extracted from artichoke leaves.

Keywords: Proteolytic enzymes, *Cynara scolymus*, Green Aqueous Two-phase Systems.

1. INTRODUÇÃO

As proteases são consideradas as enzimas mais exploradas e importantes nos setores de pesquisas e nas indústrias, com comercialização mundial de vendas acima de 65% (GARGI, SUTHINDHIRAN, 2020). Têm aplicações no mercado de alimentos e bebidas, como de panificação, sucos, produção de laticínios e clarificação de cervejas (BARBOSA et al., 2020). As enzimas proteolíticas pertencem à classe das hidrolases (3) e subclasse (3.4) das peptídeo-hidrolases ou peptidases (4) de acordo com o Comitê Internacional de Enzimas (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2018). Essas enzimas têm ampla distribuição e podem ser encontradas em diferentes fontes de vegetais, animais e microrganismos.

As proteases resultantes de fontes animais apresentam desvantagens como custo elevado, disponibilidade do abate animal e limitação por parte dos consumidores vegetarianos e veganos (NICOSIA et al., 2022). Com as fontes de microrganismos há dificuldades no controle dos parâmetros durante o processo, bem como, por questões religiosas relacionadas as proteases geneticamente modificadas (CONTESINI, MELO, SATO, 2018; AFSHARNEZHAD, SHAHANGIAN, SARIRI, 2019; SOLANKI et al., 2021). Devido às limitações de proteases de origem animal e microbiológica e à demanda na indústria de alimentos o interesse pelo estudo de novas fontes vegetais tem aumentado. Enzimas proteolíticas extraídas de vegetais apresentam benefícios como a diversidade de fontes botânicas inesgotáveis, métodos de purificação eficaz, baixa interferência das soluções no decorrer da purificação, relevante rendimento da enzima, atividade em ampla faixa de pH e temperatura, e alta estabilidade sob condições extremas (AMID et al., 2014; ALICI, ARABACI, 2018).

A alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus*) é uma planta conhecida pela extração de enzimas proteolíticas nas flores. Porém, há pouca expressão e pesquisas científicas relacionadas a enzimas obtidas do caule, brácteas e folhas. Essas partes correspondem os maiores componentes da planta e geram grandes quantidades de resíduos sólidos nas indústrias de processamento e estabelecimentos alimentícios (CONIDI, CASSANO, GARCIA-CASTELLO, 2014; COLANTUONO, FERRACANE, VITAGLIONE, 2018). Silva et al. (2021) estudaram os extratos das folhas da alcachofra e determinaram como uma nova fonte de coagulante proteolítico vegetal e potencial para substituição do coalho com presença de atividade proteolítica e específica. Além disso, relataram que é viável o desenvolvimento de pesquisas com purificação de enzimas proteolíticas a partir das folhas da alcachofra. A produção da alcachofra é realizada em todo

o mundo, com predominância na Europa, norte da África e América do Sul (FAOSTAT, 2022). Assim, pesquisas relacionadas à extração e purificação de enzimas a partir das folhas da alcachofra torna esse vegetal atraente e promissor.

O processo de purificação de enzimas constitui uma proporção importante do custo total da produção, especialmente quando se deseja alto grau de pureza. Buscam-se processos relativamente rápidos, econômicos e simples que resultem a uma melhor recuperação e manutenção das características enzimáticas. Os Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB's) estão entre as técnicas de separação/purificação de biomoléculas que podem atender a esses critérios (MEHRNOUSH, MUSTAFA, YAZID, 2011; NADAR, PAWAR, RATHOD, 2017). Com isso, pesquisas com aplicações de SAB's para partição de biomoléculas são realizadas com frequência e têm sido uma alternativa eficiente em relação aos métodos convencionais de extração líquido-líquido, como exemplo as lipases (SOUZA et al., 2015; RAMAKRISHNAN et al., 2016; PADILHA, OSÓRIO, 2019), proteases (AMID et al., 2014; SILVA et al., 2017; WU et al., 2017; SHARMA et al., 2017; FEIJOO-SIOTA et al., 2018; FERNANDES et al., 2020; SIQUEIRA et al., 2020), α -amilase (PEREIRA et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2018), lisozima e α -lactoalbumina (SAMPAIO et al., 2017), pepsina (MARCHEL, COROADINHA, MARRUCHO, 2020).

Atualmente poucos estudos estão sendo destinados a extração de proteases das folhas da alcachofra para o setor de alimentos, e desconhecemos informações sobre a purificação por meio do SAB. Diante de todo contexto, o objetivo deste estudo foi investigar a utilização dos SAB's para pré-purificar as proteases obtidas das folhas da alcachofra, e avaliar os efeitos dos parâmetros de C_{PEG} 1500 g.mol⁻¹ (10,5%, 14%, 17,5%) e C_{SAL} fosfato de sódio (9%, 12%, 15%), e pH (6,0, 7,0, 8,0) em temperatura a 25° C no comportamento da partição da enzima e verificar o perfil proteico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material e local da pesquisa

As folhas da alcachofra (*Cynara cardunculus L. var scolymus*), variedade roxa, foram adquiridas da cidade São Roque, São Paulo-SP, Brasil, com coordenadas de Latitude 23° 31' 45" Sul e Longitude 47° 08' 07" Oeste. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e utilizados sem purificação adicional. O acetato de sódio (CAS: 6131-90-4) da marca Vetec; ácido tricloroacético (CAS: 76-03-9) da Synth; A albumina do soro bovino (CAS: 9048-46-8), tirosina (CAS:60-18-4), azul brilhante de Coomassie G-250 (CAS: 6104-58-1), caseína (CAS: 9000-71-9) e fosfato de sódio (CAS: 7558-79-4) adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil. O polietileno glicol 1500 g.mol⁻¹ (PEG) foi adquirido da Êxodo científica (CAS: 25322-68-3), e o preparo das soluções com água destilada. Os demais reagentes utilizados estão descritos no decorrer da metodologia. Esta pesquisa foi desenvolvida na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus de Itapetinga, Bahia, Brasil.

2.2. Extrato das folhas da alcachofra

O extrato bruto das folhas da alcachofra foi preparado de acordo com estudo anterior realizado, que pode ser observado em Silva et al. (2021). Primeiramente, as folhas da alcachofra foram lavadas em água corrente, secas em estufa com circulação de ar a 50 °C durante 15 horas, cortadas e pesadas em balança analítica (Mettler Toledo, modelo ME204). O pré-tratamento das folhas (1:5 m/v) da alcachofra foi realizado em tampão de acetato de sódio 0,1 M/pH 5,0, com 13% (m/v) de sorbitol em incubadora Shaker (SL 222) por 20 min, temperatura de 37 °C e rotação a 200 rpm. Em seguida, as folhas (1:3 m/v) foram homogeneizadas em solução tampão acetato de sódio 0,1 M/pH 5,0 em banho ultrassônico digital (Soniclean 6), em temperatura a 35 °C, frequência 40 kHz, por 60 min. Após, foram centrifugadas (SP LABOR, modelo SP-701, Brasil) a 3248 × g durante 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi filtrado em papel filtro. Os extratos obtidos foram armazenados em temperatura de -20 °C.

2.3. Preparo dos Sistemas Aquosos Bifásicos e planejamento experimental

Os dados da partição foram baseados no estudo de Alves et al. (2021) e Silva et al. (2020). A formação do planejamento experimental está demonstrada na Tabela 1, com as diferentes concentrações de PEG (m/m), fosfato de sódio (m/m), e pH utilizados nos sistemas. Foi aplicado um fatorial 2³ completo, com 2 repetições em triplicata. Os fatores e

os níveis de baixa e alta conformação estão codificados como -1 e +1 e o ponto central como “0”.

Para purificação parcial das proteases extraídas das folhas da alcachofra, inicialmente foi preparada uma solução estoque de PEG 1500 g.mol⁻¹ a 60% (m/m), e fosfato de sódio 30% (m/m) em pH 6,0 (pHmetro microprocessado, Quimis, modelo Q400MT), ajustado com ácido fosfórico. Os SAB's foram preparados em tubos graduados de 15 mL, em temperatura de 25 °C, formados por quantidades adequadas de solução estoque de polietileno glicol 1500 g.mol⁻¹ e sal fosfato de sódio para atingir as concentrações definidas no delineamento experimental. Foi adicionado em todos os sistemas 2 g de extrato bruto das folhas da alcachofra e água quando necessário, até completar a massa final de 10g. A composição do sistema que não foi possível observar a formação do SAB após adição do extrato não foi descrita nos resultados.

Logo, depois da adição de todos os componentes, os tubos de centrífuga foram homogeneizados em vórtex (Phoenix, modelo AP-56) por 2 min e centrifugados (Centrífuga MPW, modelo 350) a 3000 × g por 20 min para acelerar a separação das fases. Em seguida, foram incubados em BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) (Tecnal, modelo TE-184, Brasil) a 25 °C por 12 horas para atingir o equilíbrio. Após este tempo as fases superiores e inferiores dos sistemas foram coletadas com auxílio de seringas e agulhas longas para quantificação do teor de proteínas, atividade proteolítica, atividade específica e parâmetros da partição.

Tabela 1. Planejamento experimental para partição da protease das folhas da alcachofra.

Variável	Nível		
	Baixo (-1)	Central (0)	Alta (+1)
C _{PEG} (%m/m) ^a	10,5	14,0	17,5
C _{SAL} ((%m/m) ^b	9,0	12,0	15,0
pH	6,0	7,0	8,0

^a Concentração de PEG 1500 g.mol⁻¹.

^b Concentração do sal fosfato de sódio.

2.4. Determinação do teor de proteínas

A concentração de proteínas no extrato bruto das folhas da alcachofra, na fase superior e fase inferior dos sistemas foram determinadas seguindo o método de Bradford (1976). A curva de calibração foi realizada utilizando a albumina de soro bovino como

padrão de referência, em cada fase dos sistemas estudados. As absorvâncias das amostras foram determinadas em um espectrofotômetro UV/VIS (Schimadzu, modelo UV-1800) a 595 nm. O branco foi preparado com tampão acetato de sódio ou fase superior pura ou fase inferior pura mais o Bradford.

2.5. Determinação da atividade proteolítica e específica

A atividade proteolítica (Equação 1) do extrato e das fases dos sistemas foi seguida pela metodologia Llorente et al. (2004). Foi adicionado 200 µL do extrato bruto ou das fases do sistema em 1 ml da solução de caseína 1% (m/v) em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,0. A reação foi conduzida a 37 °C em banho termostático (TECNAL equipamentos, modelo TE-2005) por 10 min e interrompida pela adição de 1ml de ácido tricloroacético 10% (m/v) e mantido por 20 min em banho de gelo. Posteriormente, foi centrifugado (SP LABOR, modelo SP-701, Brasil) 3248 x g por 20 min e o sobrenadante foi coletado e sua absorvância foi lida a 280 nm em espectrofotômetro UV/VIS (Schimadzu, modelo UV-1800). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1,0 µmol/mL de tirosina por min. Foi realizada curva de calibração e o branco foi preparado com tampão fosfato de potássio mais a caseína.

$$AP \left(\frac{U}{ml} \right) = \text{Tirosina} \left(\frac{\mu\text{mol}}{mL} \right) \times \left(\frac{\text{Fator de diluição}}{\text{Volume da enzima}} \right) \times \left(\frac{\text{Volume total}}{\text{Tempo de incubação}} \right) \quad (1)$$

A atividade enzimática específica (Equação 2) foi obtida a partir da razão entre a atividade proteolítica e a concentração de proteínas.

$$AEE \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{\text{Atividade proteolitica}}{\text{Proteinas}} \quad (2)$$

2.6. Determinação dos parâmetros de partição

Todos os parâmetros analisados foram seguidos pela metodologia estudada por Alves et al. (2021). O coeficiente de partição da proteína (K_p) foi obtido pela Equação 3, que determina a relação entre a concentração de equilíbrio das proteínas na fase superior (C_{sup}) e na fase inferior (C_{inf}).

$$K_p = \frac{C_{sup}}{C_{inf}} \quad (3)$$

O coeficiente de partição da atividade enzimática (K_e) foi encontrado pela relação entre a atividade enzimática na fase superior (A_{sup}) e atividade enzimática na fase inferior (A_{inf}) dos sistemas (Equação 4).

$$K_e = \frac{A_{sup}}{A_{inf}} \quad (4)$$

A seletividade (S) da enzima nos sistemas foi determinada pela razão entre o coeficiente de partição da atividade da protease (K_e) e o coeficiente de partição da proteína total (K_p) (Equação 5).

$$S = \frac{K_e}{K_p} \quad (5)$$

O fator de purificação (FP) foi definido pela razão entre a atividade específica (U/mg) da protease na fase preferencial da enzima (AE) e a atividade específica do extrato bruto (AE_{ext}) (Equação 6).

$$FP = \frac{AE}{AE_{ext}} \quad (6)$$

A recuperação teórica Y (%) dos sistemas foi calculada para selecionar o Sistema Aquoso Bifásico com melhor capacidade de extração das proteases (Equação 7). Onde: R corresponde à razão entre os volumes da fase superior e inferior e K_e corresponde ao coeficiente de partição de atividade da protease.

$$Y(\%) = \frac{100}{1 + \left(\frac{1}{RK_e}\right)} \quad (7)$$

A variação da energia livre de transferência de Gibbs (Δ_tG) foi calculada conforme a Equação 8. A espontaneidade da reação na partição do substrato entre as fases do SAB pode ser melhor compreendida no parâmetro termodinâmico Δ_tG . Sendo: R constante dos gases ideais ($8,314 \times 10^{-3} \text{ J} \cdot (\text{mol} \cdot \text{K})^{-1}$); T a temperatura absoluta; K_e o coeficiente de partição da atividade.

$$\Delta_tG \text{ (kJ} \cdot \text{mol}^{-1}\text{)} = -RT \ln K_e \quad (8)$$

2.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para o preparo do extrato bruto das folhas da alcachofra e fase superior e inferior do sistema selecionado (melhores resultados dos parâmetros de partição), foram coletados e filtrados em filtro de seringa 0,44 mm. A metodologia utilizada foi descrita por Ong, Henriksson e Shah (2007) e Silva et al. (2021). As amostras foram submetidas à Cromatografia Líquida de Fase Reversa (RP-CLAE) separadas em coluna RP-LC (Zorbax SB-C18, 4,6 mm x 250 mm de diâmetro interno, 5 µm) e pré-coluna (Zorbax SB-C 18, 4,6 mm ID x 12,5 mm, 5 µm) utilizando um sistema HP Agilent 1260 Infinity II. Foram utilizadas duas fases móveis, a primeira (A) composta de uma solução de acetonitrila (5%, V/V) e ácido trifluoroacético (0,1%, V/V) e a segunda fase (B) formada por acetonitrila (50%, V/V) e ácido trifluoroacético (0,1%, V/V). Uma alíquota de 25 µL de cada amostra foi injetada automaticamente na coluna a um fluxo de 1 mL/min na forma de gradiente das fases móveis A e B durante 60 minutos. A temperatura da corrida foi mantida em 30 °C e a detecção das proteínas foi realizada a 280 nm em um detector UV-Vis.

2.8. Cromatografia de Exclusão Molecular (CEM)

O extrato das folhas da alcachofra e as fases do sistema selecionado, foram preparados com diluição 1:1(v/v) em fosfato de sódio 0,02 M, pH 7. Os experimentos cromatográficos foram realizados com o sistema CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japan, modelo DGU20A5R), equipado com detector UV-DA e injeção automática com volume de injeção de 20 µl. A coluna de exclusão utilizada foi SRT-SEC (5 µm, 150 A, SN:7A13071, LN: BS023), com dimensão de 4,6 mm x 300 mm, obtida da Sepax Technologies (Newark, USA). A aquisição e análise de dados foram realizadas utilizando o software Shimadzu LCsolution Analysis Report. As proteínas padrão albumina de soro bovino (MM: 66,4 kDa), Quimosina (MM: 35,6 kDa), β-caseína (MM: 24 kDa), Lisozima (MM: 14,8 kDa) foram escolhidas para o estudo. O sistema foi realizado em fluxo isocrático, ou seja, bomba única com solução tampão fosfato de sódio 0,02 M, em pH 7, taxa de fluxo de 0,2 mL/min e metanol para limpeza da coluna 10%, em fluxo 0,4 mL/min. A leitura das proteínas foi feita em 215 nm e 280 nm.

2.9. Análise estatística

A influência das três variáveis independentes: concentração de PEG (C_{PEG}), concentração de sal (C_{SAL}) e pH dos sistemas formados foram verificadas sobre as variáveis

respostas: coeficiente de partição da proteína (K_p), coeficiente de partição da atividade enzimática (K_e), seletividade (S), fator de purificação da fase superior rica em PEG ($F.P._{PEG}$), recuperação teórica enzimática (Y) e variação da energia livre de transferência de Gibbs ($\Delta_t G$). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de regressão múltipla adotando-se a equação polinomial descrita abaixo (Equação 9).

$$R = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (9)$$

Onde R é a variável resposta, β_0 o intercepto, β_i o coeficiente linear, β_{ii} o coeficiente quadrático, β_{ij} o de interação, x_i e x_j as variáveis independentes e ε o erro. A adequação do modelo foi determinada pela sua significância e dos parâmetros ($p < 0,05$), da falta de ajuste não significativa ($p > 0,05$) e determinação dos coeficientes de regressão R^2 e R^2 ajustado ($R^2 > 0,90$). Os critérios considerados estatisticamente não significativos ($p > 0,05$) foram removidos inicialmente e os dados experimentais foram rodados novamente com as variáveis independentes significativas. Apenas as variáveis, os termos quadráticos ou de interações com significância superior a 95% ($p < 0,05$) foram incluídos nos modelos. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar o ajuste do modelo.

A análise estatística foi realizada por meio do software estatístico Statistical Analysis System® versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Em seguida, com base nos modelos encontrados foram construídos gráficos de superfície pelo programa Sigma Plot v. 11.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Partição das proteases das folhas da alcachofra por Sistemas Aquosos Bifásicos

Os resultados dos parâmetros de partição, coeficiente de partição da proteína (K_p), coeficiente de partição da atividade enzimática (K_e), seletividade (S), fator de purificação (F.P.PEG), índice de recuperação teórica (Y) e energia livre de transferência de Gibbs (Δ_tG), das proteases presentes nos extratos das folhas da alcachofra nos SAB estudados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados dos parâmetros da partição da protease das folhas da alcachofra.

Sistema	C _{PEG} (%)	C _{SAL} (%)	pH	K_p	K_e	S	F.P.PEG	Y (%)	Δ_tG
1	10,5	9	6	5,480±	3,443±	0,628±	0,338±	71,594±	-3,086±
				0,073	0,047	0,052	0,0347	0,276	0,034
2	17,5	9	6	2,616±	4,610±	1,762±	0,387±	83,93±	-3,786±
				0,028	0,123	0,066	0,011	0,359	0,066
3	10,5	15	6	9,706±	7,209±	0,743±	0,592±	74,249±	-4,894±
				0,499	0,114	0,026	0,271	0,302	0,039
4	10,5	9	8	7,558±	10,60±	1,436±	0,437±	89,454±	-5,850±
				1,597	0,073	0,313	0,012	0,065	0,017
5	17,5	9	8	5,498±	2,286±	0,416±	0,572±	74,054±	-2,047±
				0,332	0,133	0,001	0,053	1,121	0,145
6	10,5	15	8	8,187±	4,050±	0,495±	0,415±	65,135±	-3,464±
				0,600	0,171	0,015	0,022	0,957	0,104
7	17,5	15	8	12,875±	1,928±	0,150±	0,667±	69,101±	-1,626±
				0,177	0,042	0,001	0,067	0,465	0,054
8	14	12	7	7,822±	4,050±	0,516±	0,404±	77,015±	-3,454±
				0,365	0,557	0,047	0,037	2,440	0,342
9	14	12	7	6,749±	4,533±	0,675±	0,372±	79,861±	-3,744±
				0,572	0,109	0,073	0,005	0,388	0,060

C_{PEG} – Concentração de PEG 1500 g.mol⁻¹.

C_{SAL} – Concentração de fosfato de sódio.
 K_p – Coeficiente de partição da proteína.
 K_e – Coeficiente de partição da atividade enzimática.
S – Seletividade.
F.P.PEG – Fator de purificação na fase superior, rica em PEG.
Y – Recuperação teórica.
 Δ_tG – Variação da energia livre de transferência de Gibbs.

Verifica-se que as proteínas presentes no extrato das folhas da alcachofra têm maior afinidade com os componentes da fase superior (rica em PEG) dos sistemas estudados, pois o valor de K_p foi maior que 1 em todos os sistemas. Observa-se que, as proteínas presentes com atividade proteolítica migraram preferencialmente para fase polimérica, com resultado de K_e maior que 1 em todos os sistemas. Os sistemas com C_{PEG} 10,5%, C_{SAL} 15% em pH 6, e de C_{PEG} 10,5% e 17,5% C_{SAL} 15% em pH 8 demonstraram valores maiores para partição das proteínas em comparação aos demais sistemas. Em relação às enzimas com atividade proteolítica o sistema em destaque foi com C_{PEG} 10,5%, C_{SAL} 9% em pH 8 que apresentou valor elevado de K_e (10,603) para a proteína de interesse e valor superior ao K_p . No entanto, pode-se visualizar que os menores resultados para K_e foram nos sistemas com maiores C_{PEG} e pH, e C_{SAL} 9% e 15%.

Portanto, é possível analisar que as enzimas de interesse nas folhas da alcachofra apresentaram caráter hidrofóbico devido predominância de $K_e > 1$ e em virtude da fase inferior apresentar maior hidrofiliabilidade (COSTA et al., 2015). Chaiwut, Rawdkuen, Benjakul (2010) estudaram a extração da enzima proteolítica da planta *Calotropis procera* e o particionamento da enzima em SAB. Estes autores encontraram valores para K_p e K_e menores que 1 e observaram que a combinação de diferentes concentrações de PEG e sal foi necessária para o processo de separação. Verificaram também, que os resultados do coeficiente de partição nos sistemas tiveram influência da concentração de PEG para formação de fase; quanto maior a concentração de sal foi observada uma diminuição do coeficiente de partição; e o aumento do pH para 7,0 e 9,0 aumentou acentuadamente o K_e .

Segundo Padilha et al. (2019), a carga, o tamanho e a hidrofobicidade das biomoléculas são parâmetros complexos e dependem do sucesso do particionamento dos Sistemas Aquosos Bifásicos. Com isso, o tipo do Sistema, fatores como pH, conteúdo dos componentes, massa molecular, razão de volume de fase, têm influência importante na alteração das características das biomoléculas. Os autores também relataram que o PEG 1500 por possuir massa molecular menor que outros PEG promovem maior fluidez relacionada a

uma menor viscosidade em contato com o sal fosfato. Sendo assim, auxilia em maior transferência de massa para a fase superior quando comparada com a fase inferior.

Para que o processo de purificação de enzimas seja considerado eficiente, é necessário averiguar se a enzima de interesse está separada dos contaminantes. A seletividade determina a capacidade do SAB em separar uma molécula biológica de interesse, de proteínas diversas em fases diferenciadas. Com os valores mais elevados de K_e em relação a K_p , a seletividade dos sistemas compostos por C_{PEG} 17,5%, C_{SAL} 9% em pH 6,0, e C_{PEG} 10,5%, C_{SAL} 9% em pH 8,0 obtiveram maiores resultados dentre os sistemas estudados, sendo 1,762 e 1,436, respectivamente. Com estes resultados percebe-se que nestes sistemas com diferentes concentrações de PEG, menor concentração de sal e diferentes pH houve predominância do parâmetro seletividade. O estudo de Amid et al. (2012) de protease vegetal destaca que os pH em SAB's podem influenciar no aumento ou redução da seletividade e à medida que aumentaram o pH dos sistemas de 6,0 para 8,0 verificaram maiores valores do parâmetro. Amid, Manap e Shuhaimi (2013) estudaram as proteases das folhas da kesinai em SAB e encontraram resultado para seletividade (0,043) inferior a esta pesquisa. Valores maiores para seletividade (1,691 a 3,427) foram observados por Alves et al. (2021) na partição por SAB (formados por PEG e fosfato de sódio) de proteases das folhas da ora-pro-nobis.

O fator de purificação está relacionado com a eficiência de purificar o extrato na fase preferencial da enzima nos sistemas particionados, e geralmente, os valores são relativamente baixos na utilização dos Sistemas Aquosos Bifásicos (PILLACA-PULLO et al., 2020). Entre os sistemas analisados para o parâmetro F.P._{PEG} percebe-se que houve destaque nos sistemas com C_{PEG} 17,5%, C_{SAL} 15% em pH 8,0 com valor de F.P._{PEG} 0,667, C_{PEG} 10,5%, C_{SAL} 15% em pH 6,0 com valor 0,592 e C_{PEG} 17,5%, C_{SAL} 9% em pH 8,0 com valor 0,572.

O índice de recuperação (Y) está associado com a quantidade de atividade enzimática que é possível preservar na fase superior ou inferior em relação a atividade inicial no sistema. É possível constatar que o Y do sistema com C_{PEG} 10,5%, C_{SAL} 9% em pH 8 foi 89,45% e com C_{PEG} 17,5%, C_{SAL} 9% em pH 6 foi 83,93%, esses valores foram superiores aos demais sistemas estudados que apresentaram desempenho acima de 65% e abaixo de 80%. Estes resultados são considerados elevados e provavelmente a interação do PEG com a enzima não afetam negativamente na sua estrutura e atividade (DE MEDEIROS E SILVA et al., 2013). Na pesquisa de Zhu e Zhang (2019) foi descrito que os valores encontrados para recuperação da atividade enzimática e o coeficiente de partição das proteínas nos sistemas estudados com diferentes concentrações de sal, líquido iônico, dosagem de papaína e pH,

aumentaram em pH 8,0. A mudança de pH pode alterar a carga elétrica da superfície da fonte estudada e afetar sua distribuição entre as duas fases.

A partir dos parâmetros F.P._{PEG} e Y (%) apresentados na Tabela 2 pode-se verificar de forma conjunta que os resultados para o sistema de C_{PEG} 10,5%, C_{SAL} 9% e pH 8,0, em comparação aos demais foi considerado o melhor por apresentar elevado F.P._{PEG} (0,437) e maior Y (89,454%), influenciando de forma positiva o processo de separação. Resultados próximos ao estudo foram encontrados por Alves et al. (2021) no F.P. (0,463 a 1,116) de protease vegetal, e inferiores no parâmetro Y (64,373 a 73,204). Rocha et al. (2016) utilizaram o SAB com PEG para particionar a protease da *Carica papaya* e obtiveram F.P. com variação de 1 a 2,41, com melhor desempenho de purificação observado na fase superior, e Y com valor baixo (13%) e elevados (72,0% e 85%).

O deslocamento da enzima para fase superior ou inferior necessita do rompimento de interações dessa biomolécula com os componentes de uma determinada fase para outra. O parâmetro termodinâmico da energia livre de transferência de Gibbs (Δ_tG) apresentou valores negativos em todos os SAB estudados. Com isso, evidenciou que a partição das enzimas proteolíticas para a fase polimérica foi termodinamicamente favorável, ou seja, um processo espontâneo ($\Delta_tG < 0$). Segundo Da Silva e Loh (2006) quanto maior Δ_tG em sua forma negativa mais espontâneo é o processo de partição, como foi observado no presente estudo.

A Δ_tG é uma propriedade que tem contribuições entrópicas e de entalpias durante o processo de partição de biomoléculas nos SAB. A presença de efeitos entrópicos contribui para que a enzima seja direcionada a fase salina do SAB, em razão da elevada densidade numérica de moléculas de água por unidade de volume, em comparação com a fase polimérica (ALCÂNTARA et al., 2011). Sendo assim, demonstrou que a migração de enzimas proteolíticas do extrato das folhas da alcachofra para fase superior, possivelmente teve influência de natureza entálpica e não entrópica. A contribuição entálpica está relacionada com os rompimentos das interações intermoleculares realizadas e das novas interações formadas do soluto durante a transferência na partição do SAB.

Os resultados referentes a partição dos sistemas por meio do planejamento experimental foram submetidos a análise de regressão múltipla. As condições estudadas foram as variáveis independentes: concentrações de PEG e SAL, diferentes valores de pH; e as variáveis respostas: K_p , K_e , S, F.P._{PEG}, Y e Δ_tG , como demonstrado na Tabela 3. A partir dos dados da análise estatística foram ajustados modelos com a finalidade de prever o comportamento destes parâmetros para os sistemas. Foi possível verificar se a falta de ajuste

foi não significativa ($p > 0,05$), e os parâmetros e interações significativos, seguidos de acordo com os níveis de probabilidade calculados inferiores a 5%. Os valores do coeficiente de determinação R^2 e R^2 ajustado da análise de regressão puderam validar a correlação dos resultados e suas adequações.

Tabela 3. Modelos estatísticos referentes às variáveis respostas com seus respectivos resultados.

Modelos	Falta de ajuste	Coefficiente de determinação	Equação
$K_p = 3,601 - 1,908 \cdot C_{PEG} + 2,831 \cdot pH + (0,168 C_{PEG} \cdot C_{SAL}) - (0,203 \cdot C_{SAL} \cdot pH)$	0,129	$R^2 = 0,931;$ $R^2 \text{ aj.} = 0,909$	Eq. 10
$K_e = - 73,681 - 1,201 \cdot C_{PEG} + 4,238 \cdot C_{SAL} + 18,433 \cdot pH + (0,146 \cdot C_{PEG} \cdot C_{PEG}) + (0,147 \cdot C_{PEG} \cdot C_{SAL}) - (0,677 \cdot C_{PEG} \cdot pH) - (0,86 \cdot C_{SAL} \cdot pH)$	0,050	$R^2 = 0,994;$ $R^2 \text{ aj.} = 0,991$	Eq. 11
$S = - 10,186 - 0,036 \cdot C_{PEG} + 0,379 \cdot C_{SAL} + 2,812 \cdot pH + (0,035 \cdot C_{PEG} \cdot C_{PEG}) + (0,016 \cdot C_{PEG} \cdot C_{SAL}) - (0,154 \cdot C_{PEG} \cdot pH) - (0,088 \cdot C_{SAL} \cdot pH)$	0,187	$R^2 = 0,969;$ $R^2 \text{ aj.} = 0,947.$	Eq. 12
$F.P._{PEG} = 0,419 + 0,349 \cdot C_{PEG} + 0,165 \cdot C_{SAL} + 0,310 \cdot pH + (0,012 \cdot C_{PEG} \cdot C_{PEG}) + (0,004 \cdot C_{PEG} \cdot C_{SAL}) - (0,027 \cdot C_{SAL} \cdot pH)$	0,403	$R^2 = 0,928;$ $R^2 \text{ aj.} = 0,889$	Eq. 13
$Y = - 202,261 + 9,357 \cdot C_{PEG} + 8,923 \cdot C_{SAL} + 49,094 \cdot pH + (0,449 \cdot C_{PEG} \cdot C_{SAL}) - (1,946 \cdot C_{PEG} \cdot pH) - (2,207 \cdot C_{SAL} \cdot pH)$	0,018	$R^2 = 0,979;$ $R^2 \text{ aj.} = 0,969$	Eq. 14
$\Delta_t G = 37,452 - 0,616 \cdot C_{PEG} - 1,922 \cdot C_{SAL} - 7,951 \cdot pH - (0,036 \cdot C_{PEG} \cdot C_{PEG}) - (0,047 \cdot C_{PEG} \cdot C_{SAL}) + (0,323 \cdot C_{PEG} \cdot pH) + (0,351 \cdot C_{SAL} \cdot pH)$	0,059	$R^2 = 0,991;$ $R^2 \text{ aj.} = 0,984$	Eq. 15

R² aj. – R² ajustado.

Eq. – Equação.

O modelo matemático linear múltiplo em K_p, e quadrático em K_e e S foram observados e estão descritos na Equação 10, 11 e 12. Os resultados referentes a estes parâmetros demonstraram que os modelos tiveram efeitos significativos a 95% de confiança (p<0,05), a falta de ajuste para os parâmetros provou ser não significativa (p>0,05) e os coeficientes de determinação (R²>0,90) declararam alta significância dos modelos. Pode-se constatar que os modelos obtidos foram adequados para explicar o K_p, K_e e S dos sistemas realizados.

Os modelos visualizados nas Equações 13, 14 e 15 descrevem o comportamento do F.P._{PEG}, Y e Δ_tG dos sistemas, respectivamente. O modelo quadrático melhor descreveu o F.P._{PEG} e Δ_tG, e o modelo linear múltiplo descreveu o parâmetro Y, e indicaram que são significativos (p<0,05) para variáveis dependentes estudadas. A falta de ajuste (p>0,05) se mostrou não significativa para F.P._{PEG} e Δ_tG, e significativa para Y. O coeficiente de determinação encontrado para todos os modelos apresentou alto valor. Portanto, os modelos encontrados se ajustaram bem aos dados, ou seja, foram relevantes para estudar o comportamento das variáveis.

A partir dos modelos encontrados foram realizados gráficos de superfície, para isso foi necessário fixar um parâmetro dentre as variáveis independentes. A concentração de sal foi a opção que apresentou menos efeito no sistema inicialmente, com isso, o sistema com C_{SAL} 9% foi escolhido para fixar nos gráficos.

3.2. Efeito das variáveis independentes no coeficiente de partição das proteínas e da atividade enzimática

As Figuras 1a e 1b demonstraram que a menor concentração de PEG (10,5%), em pH 8 resultou no alto valor de K_p e K_e. Observou-se que, à medida que foi reduzida a concentração de PEG e aumento do pH houve elevação dos valores de K_p. No entanto, os menores valores de K_p foram encontrados em C_{PEG} (17,5%) elevada e menores pH. Pode-se verificar que houve influência da interação do PEG e pH no comportamento K_e. Os resultados de K_e foram diretamente proporcionais aos valores de pH, quanto maior o pH, mais elevado o K_e em menores concentrações de PEG.

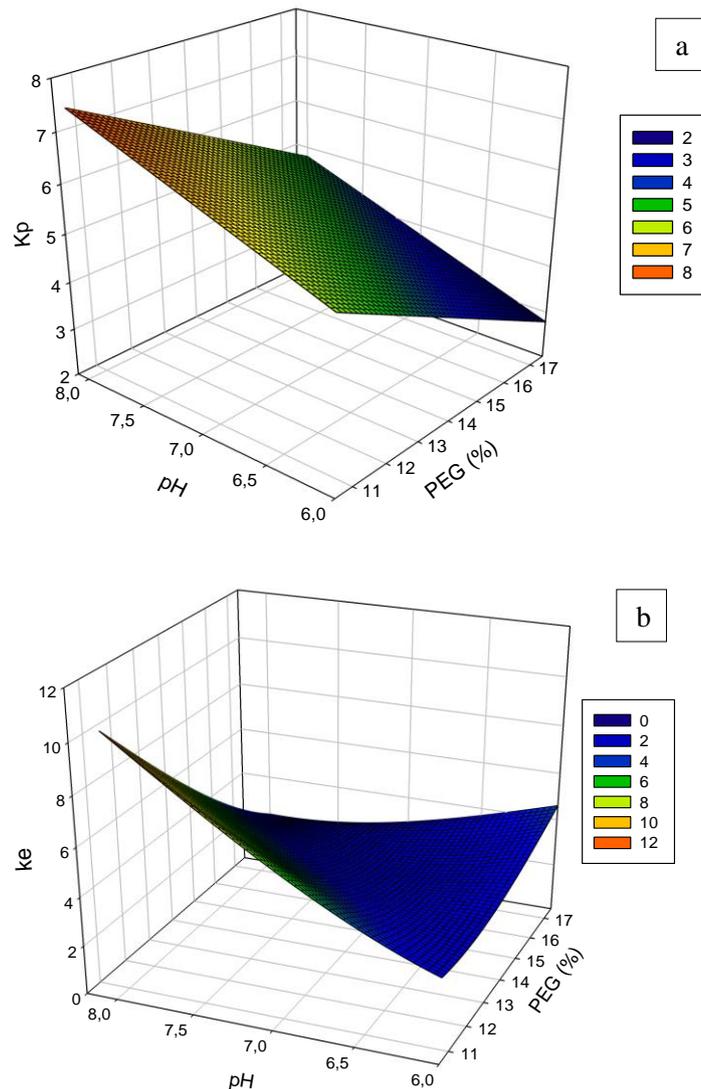


Figura 1. Efeito da concentração de PEG (%) e pH no coeficiente de partição da proteína (a) e coeficiente de partição da atividade enzimática (b).

3.3. Efeito das variáveis independentes na seletividade

Com base no modelo proposto foi construído o gráfico de superfície (Figura 2) para a seletividade, na qual foi possível visualizar a relação e comportamento deste parâmetro. Os maiores resultados para S podem ser verificados nas extremidades da Figura 2, sendo os sistemas com concentração de PEG menor e pH 8, e nos sistemas de concentração de PEG maior e pH 6. No entanto, resultados inferiores para S podem ser visualizados nos sistemas com elevada concentração de PEG e pH. Resultados mais próximos de zero implicam que

K_e é menor que K_p , permitindo concluir que houve separação entre enzimas e as demais proteínas em fases diferentes.

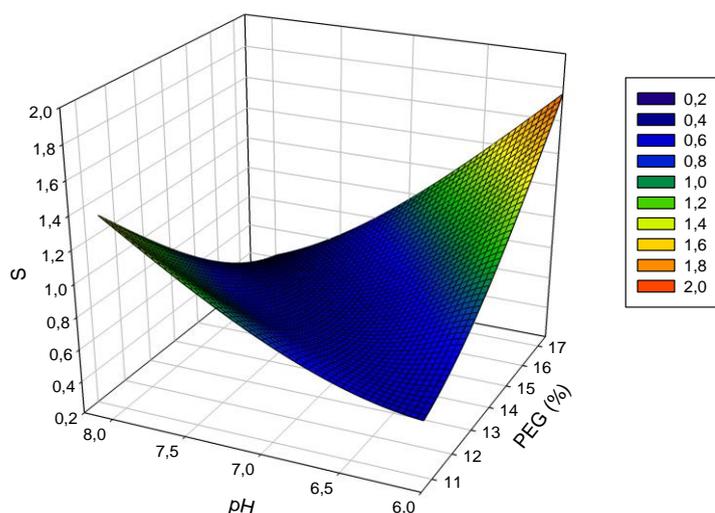


Figura 2. Efeito da concentração de PEG (%) e pH na seletividade.

3.4. Efeito das variáveis independentes no fator de purificação e índice de recuperação teórica

Os sistemas com menor e maior concentração de PEG, e ambos em pH 8 apresentaram comportamento com elevados valores de $F.P._{PEG}$, como demonstrados no gráfico de superfície (Figura 3a). Os menores resultados de $F.P._{PEG}$ podem ser visualizados nos sistemas entre C_{PEG} 10,5% a 14% em pH 6,0 – 7,0, que possivelmente estão relacionados ao tipo das enzimas presentes. De forma geral, houve redução no $F.P._{PEG}$ dos sistemas com pH menor comparado com os sistemas em pH 8,0. O comportamento da Y nos SAB pode ser observado na Figura 3b, onde se observa que em menor concentração de PEG e maior pH o resultado de Y foi mais elevado. À medida que aumentou a concentração de PEG em pH 6,0, o valor de Y também aumentou. No entanto, em pH 8,0 a redução na concentração de PEG favoreceu o aumento de Y. Tanto para $F.P._{PEG}$ como para Y o pH de 8,0 foi o que apresentou os melhores resultados.

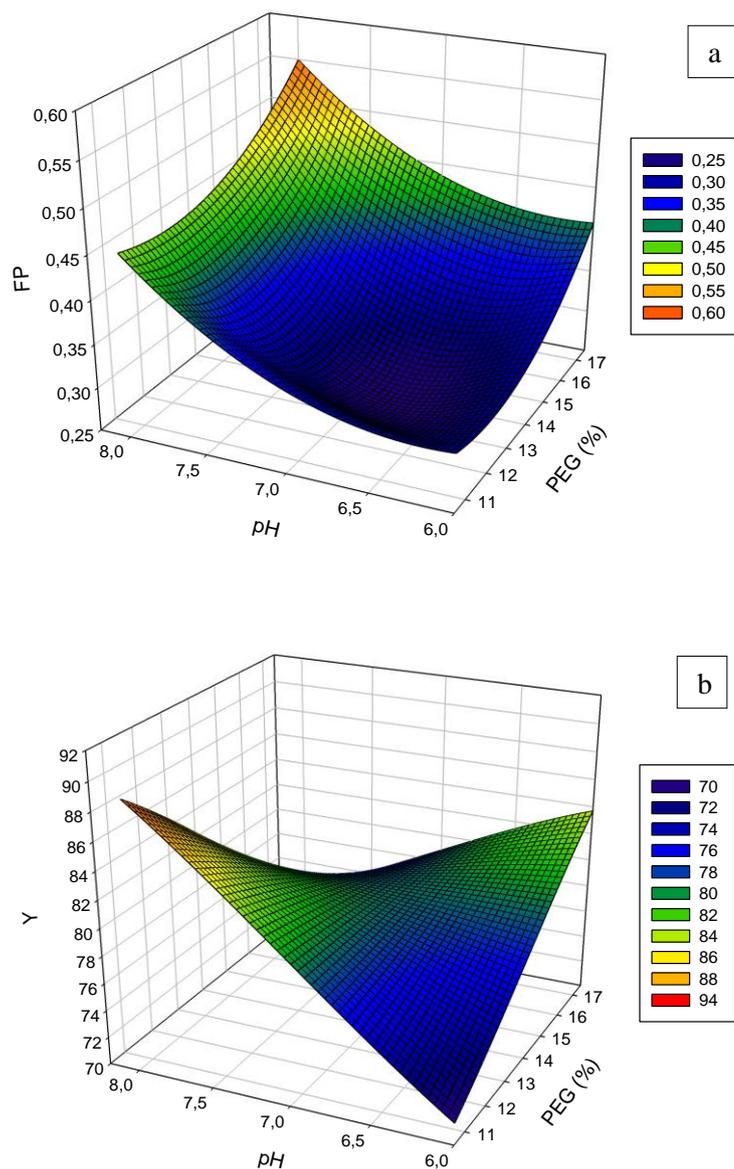


Figura 3. Efeito da concentração de PEG (%) e pH no fator de purificação (a) e índice de recuperação teórica (b).

3.5. Efeito das variáveis independentes na energia livre de transferência de Gibbs

Na Figura 4 pode-se visualizar o gráfico de superfície para $\Delta_t G$. Os sistemas com partição mais favoráveis, de menores valores de $\Delta_t G$ estão demonstrados no lado inferior do gráfico, o qual correspondem a altos valores de pH e baixa C_{PEG} . Os maiores valores de $\Delta_t G$ podem ser verificados no lado superior do gráfico em sistemas de maior pH e maior C_{PEG} .

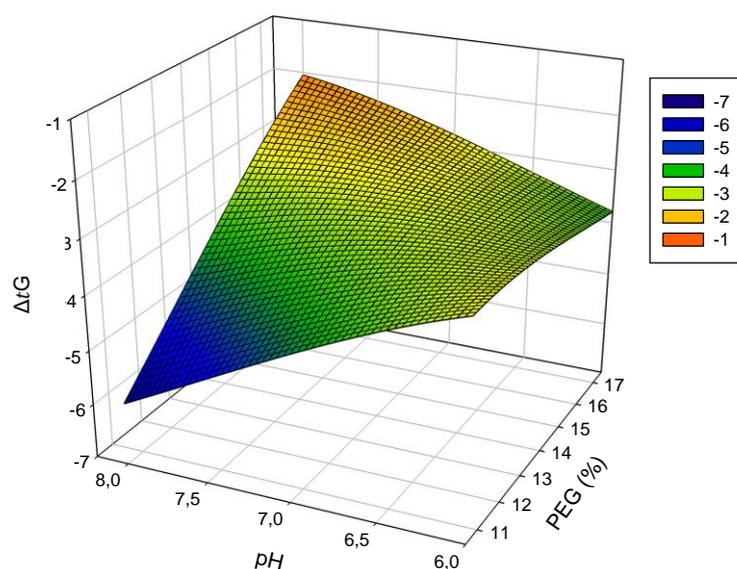


Figura 4. Efeito da concentração de PEG (%) e pH na variação de Energia Livre de Transferência de Gibbs.

Diante dos resultados encontrados para os parâmetros avaliados na partição da protease das folhas da alcachofra com os Sistemas Aquosos Bifásicos, foi realizada a escolha do sistema com C_{PEG} 10,5%, C_{SAL} 9%, e pH 8 para dar continuidade nas análises com mais detalhes sobre a fase superior e inferior. As análises da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia de Exclusão Molecular (CEM) foram executadas e estão demonstradas posteriormente. Tal sistema selecionado mesmo não obtendo o melhor desempenho no $F.P._{PEG}$ dentre os sistemas avaliados, apresentou os maiores valores para o K_e e Y , e menor valor de Δ_rG foi observado, sendo mais espontâneo. Selecionar o sistema com maior quantidade da proteína alvo e recuperação teórica enzimática, seria mais interessante do que outros sistemas com resultados inferiores referente a estes parâmetros e somente o $F.P._{PEG}$ em maior valor. A composição desse sistema também se torna favorável, por utilizar menores C_{PEG} e C_{SAL} para sua formação.

3.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia de Exclusão Molecular (CEM)

O extrato das folhas da alcachofra, e o sistema particionado com extrato, C_{PEG} 10,5%, C_{SAL} 9% e pH 8 foram analisados por cromatogramas na CLAE com coluna C18 em 280 nm, como exibido na Figura 5. A cromatografia líquida foi realizada a fim de verificar o

perfil e a separação dos compostos proteicos na fase superior (SIST4FS) e inferior (SIST4FI) do sistema 4. Os perfis peptídicos dos tratamentos avaliados foram discutidos de modo qualitativo (espectros UV dos picos), tempo de retenção e intensidade mAU no decorrer do texto.

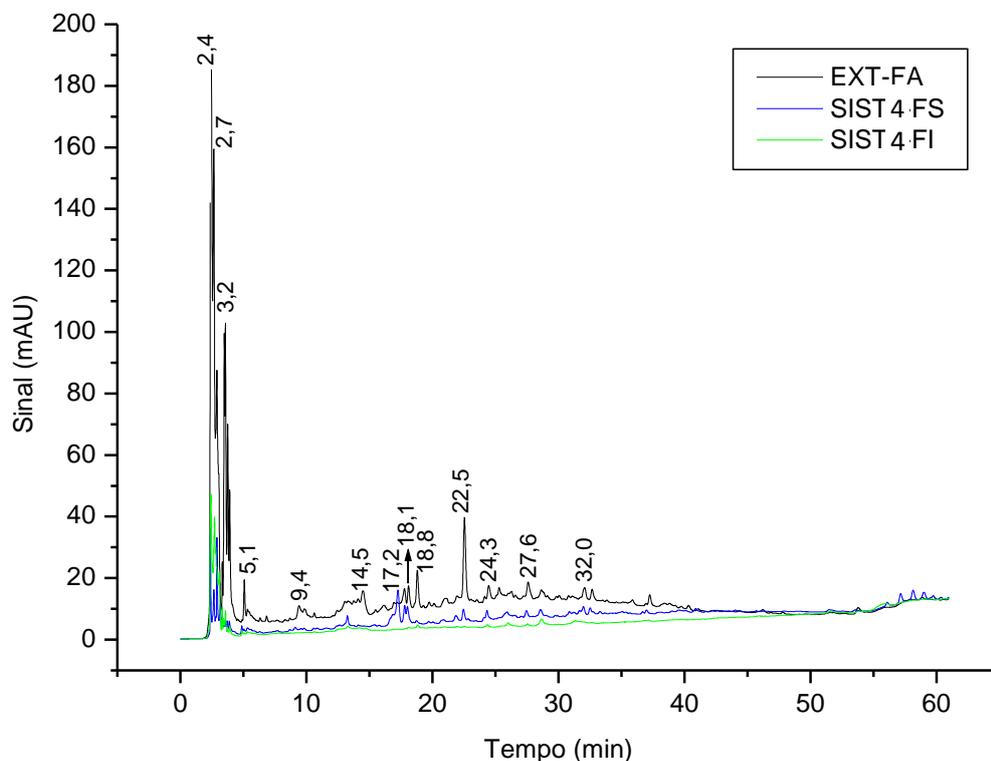


Figura 5. Cromatograma de CLAE do extrato (EXT-FA) de proteína das folhas de alcachofra e a fase superior (SIST4FS) e fase inferior (SIST4FI) do sistema.

Os tempos de retenção da amostra EXT-FA com maior intensidade foram no intervalo de 2,3 min a 5,1 min, com variação de 19,6 mAU até 185,4 mAU. Nas bandas dos tempos 14 min a 27,6 min foi possível encontrar valores de 16,0 mAU a 39,8 mAU, e nos demais tempos verificou-se picos menores que 16,0 mAU. Silva et al. (2021) realizaram o perfil cromatográfico em CLAE do extrato das folhas da alcachofra e verificaram bandas nos primeiros momentos de análise (2-5 min) e entre 12 min a 40 min que foram predominantes, utilizando o mesmo método de extração realizado nesta pesquisa, com acetato de sódio e ultrassom, e cromatografia (RP-CLAE) com solução de acetonitrila e ácido trifluoroacético em coluna C18, a 280 nm e 60 min.

Observa-se que o perfil cromatográfico peptídico da fase superior do sistema apresentou semelhança de alguns picos com o extrato bruto, porém em menor intensidade. Com isso, pôde-se confirmar que a maior parte das proteínas tiveram preferência a fase rica em polietileno glicol (PEG). Com a cromatografia foi possível evidenciar a purificação parcial das proteases na fase superior, havendo separação de compostos para fase inferior que foram visualizados no EXT-FA. Os resultados da CLAE revelaram uma diferença notável na quantidade e intensidade dos picos das proteínas na fase superior em relação a fase inferior.

O SIST4FI apresentou 9 picos, na qual pôde-se identificar compostos proteicos limitados em comparação ao SIST4FS, que contém 15 picos detectados. A maioria dos picos do SIST4FI foram similares ao SIST4FS, porém, em menor intensidade. Com exceção dos picos no tempo de retenção 2,4 min (47,4 mAU) e 2,7 min (40,0 mAU) que se apresentaram em maior intensidade em relação ao SIST4FS, que tiveram resultados 36,6 mAU e 16,28 mAU, respectivamente. Na fase inferior foram reveladas bandas únicas em 2,8 min (30,04 mAU) e 3,0 min (22,05 mAU) que não foram demonstradas na fase superior.

As bandas predominantes na fase superior, mas que não foram detectadas na fase inferior podem ser encontradas no tempo de eluição de 2,9 min (29,6 mAU), 3,2 min (11,6 mAU), 17,2 min (16,08 mAU), 17,8 (11,16 mAU), 18,1 min (10,8 mAU), 22,5 min (10,0 mAU) e 32,0 min (10,76 mAU). A região das bandas no SIST4FS e SIST4FI nos intervalos de tempo 12,9 min - 15,1 min e 28,02 min – 29,3 min evidenciaram comportamentos similares, ou seja, fazem parte do mesmo grupo de proteínas ou apresentam proteínas com as mesmas características. Vale ressaltar que a intensidade elevada de compostos proteicos foi revelada em picos específicos no gráfico. Como a fase superior apresentou elevado K_e , é possível que proteínas em destaques sejam proteases.

A análise de cromatografia de exclusão molecular foi efetuada e a partir desta observou-se que o extrato das folhas da alcachofra e as fases do sistema contêm bandas de proteínas com massas molares que variaram de 17 kDa a 70,22 kDa. As bandas predominantes nos tratamentos avaliados tiveram menor resultado no extrato (EXT-FA), seguido da fase superior (SIST4FS) e maior na fase inferior (SIST4FI) do sistema. Nas bandas secundárias a proteína de maior massa molar foi detectada na fase superior do sistema, seguido da fase inferior e o extrato.

Tabela 4. Massas molares do extrato das folhas da alcachofra e da fase superior e inferior do sistema C_{PEG} 10,5%, C_{SAL} 9%, e pH 8.

Amostras	Massas molares	
	Bandas predominantes	Bandas secundárias
EXT-FA	17,35 kDa	56,89 kDa
SIST4FS	21,34 kDa	70,22 kDa
SIST4FI	32,27 kDa	59,89 kDa

Mazorra-Manzano et al. (2013), avaliaram o perfil proteico do extrato das flores de laranjeira e encontraram massa molar variando de 32 kDa a 90 kDa. Nasiri et al. (2020) estudaram as enzimas proteolíticas parcialmente purificadas da mesma planta e identificaram uma banda principal com massa molar de 30 kDa. A massa molar (75,0 kDa e 79,4 kDa) das proteases das folhas de kesinai purificada foi estimada em valor próximo ao SIST4FS do presente estudo (PAGTHINATHAN et al., 2019). A enzima citada anteriormente foi descrita como uma fonte alternativa para substituição do coalho animal. Fontes vegetais com tal potencial podem servir na substituição da quimosina bovina (35,6 kDa), renina (30,7 kDa), búfala (23,0 kDa) e cabra (36,0 kDa).

4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as proteases das folhas de alcachofra particionaram preferencialmente para a fase rica em PEG em todos os sistemas ($K_e > 1$), por apresentarem caráter hidrofóbico, independente da C_{PEG} , C_{SAL} e pH utilizados. As proteínas em geral apresentaram melhor afinidade ($K_p > 1$) também com a fase superior. A partição das enzimas proteolíticas para fase polimérica ocorreu de forma espontânea em todos os sistemas ($\Delta_t G < 0$).

Todos os modelos abordados foram relevantes para descrever os parâmetros K_p , K_e , S , FP , Y e $\Delta_t G$. Percebe-se que houve forte influência do PEG e pH nas variáveis respostas. Com a redução da C_{PEG} observou-se aumento no parâmetro K_p ; o comportamento do K_e foi diretamente proporcional ao aumento do pH; o $F.P._{PEG}$ diminuiu em pH mais baixo; a menor C_{PEG} e maior pH auxiliaram no aumento de Y . O sistema selecionado com C_{PEG} 10,5%, C_{SAL} 9% e pH 8 apresentou elevado K_e e Y , a fase superior revelou bandas de proteínas únicas em comparação com a fase inferior, que podem estar associadas às proteases. Com a CEM foi possível encontrar semelhança dos resultados da fase superior com estudos de proteases de fontes vegetais.

Diante de todo contexto, esta pesquisa demonstrou potencial do SAB como estágio primário da extração e purificação de proteases a partir das folhas da alcachofra, com relevância para posteriores estudos e aplicações na área de alimentos que almejem a utilização de proteases de uma fonte não convencional e vegetal com resultados já mencionados para os parâmetros da partição. Para purificação total desta enzima faz-se necessário a aplicação de uma técnica complementar na fase superior do sistema selecionado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFSHARNEZHAD, M.; SHAHANGIAN, S. S.; SARIRI, R. A novel milk-clotting cysteine protease from *Ficus johannis*: Purification and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 173–182, 2019.
- ALCÂNTARA, L. A. P. et al. Application of the response surface methodology for optimization of whey protein partitioning in PEG/phosphate aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 21, p. 1881–1885, 2011.
- ALICI, E. H.; ARABACI, G. A novel serine protease from strawberry (*Fragaria ananassa*): Purification and biochemical characterization. **Biological Macromolecules**, n. 2017, p. 1295 - 1304, 2018.
- ALVES, et al. Extraction of protease from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) and partial purification in polyethylene glycol + sodium phosphate aqueous two-phase system. **Journal of Food Processing and Preservation**, p. 1-13, 2021.
- AMID, M. et al. Purification of serine protease from mango (*Mangifera Indica* Cv. Chokanan) peel using an alcohol/salt aqueous two phase system. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1382–1386, 2012.
- AMID, M.; MANAP, M. Y. A.; SHUHAIMI M. Purification of a novel protease enzyme from kesinai plant (*Streblus asper*) leaves using a surfactant–salt aqueous micellar two-phase system: a potential low cost source of enzyme and purification method. **European Food Research and Technology**, v. 237, p. 601–608, 2013.
- AMID, M. et al. Purification and Characterization of Alkaline-Thermostable Protease Enzyme from Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) Waste: A Potential Low Cost of the Enzyme. **BioMed Research International** changes, v. 2014, 2014.
- BARBOSA, E. E. P. et al. Mushroom cultivation edible in lignocellulosic residues from rainforest for protease production. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 92475–92485, 2020.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72(1- 2): 248-254, 1976.
- CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S.; BENJAKUL, S. Extraction of protease from *Calotropis procera* latex by polyethylene glycol-salts biphasic system. **Process Biochemistry**, v.

45, n. 7, p. 1148–1155, 2010.

COLANTUONO, A.; FERRACANE, R.; VITAGLIONE, P. Potential bioaccessibility and functionality of polyphenols and cynaropicrin from breads enriched with artichoke stem. **Food Chemistry**, v. 245, n. March 2017, p. 838–844, 2018.

CONIDI, C.; CASSANO, A.; GARCIA-CASTELLO, E. Valorization of artichoke wastewaters by integrated membrane process. **Water Research**, v. 48, n. 1, p. 363–374, 2014.

CONTESINI, F. J.; MELO, R. R. DE; SATO, H. H. An overview of Bacillus proteases: from production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 321–334, 2018.

COSTA, A. R. DA et al. Partitioning of bovine lactoferrin in aqueous two-phase system containing poly(ethylene glycol) and sodium citrate. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 118–124, 2015.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimento de Fennema**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

DA SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**. v. 29, p. 1345-1351, 2006.

DE MEDEIROS E SILVA, G. M. et al. Extraction of fibrinolytic proteases from *Streptomyces* sp. DPUA1576 using PEG-phosphate aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, 339, 52–57, 2013.

ESPOSITO, M. et al. Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease. **Food Chemistry**, v. 204, p. 115–121, 2016.

FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: < <https://www.fao.org/faostat/en/#home> >, acesso em 2022.

FEIJOO-SIOTA, L. et al. Expression, activation and processing of a novel plant milk-clotting aspartic protease in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 268, p. 28–39, 2018.

FERNANDES, L. M. G. et al. Purification and characterization of a novel *Aspergillus* heteromorphus URM 0269 protease extracted by aqueous two-phase systems PEG/citrate. **Journal of Molecular Liquids**, v. 317, p. 113957, 2020.

- GARGI, S.; SUTHINDHIRAN, K. Extraction and characterization of alkaline protease from *Streptomyces* sp. GS - 1 and its application as dehairing agent. *Biocatal. Agricultural Biotechnology*, v. 25, p. 101590, 2020.
- LLORENTE, B. E.; BRUTTI, C. B.; CAFFINI, N. O. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26):8182-8189, 2004.
- MARCHEL, M.; COROADINHA, A. S.; MARRUCHO, I. M. Novel acidic deep eutectic solvent-based aqueous biphasic systems for efficient extraction of pepsin. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 8, p. 12400-12408, 2020.
- MAZORRA-MANZANO, M. A. et al. Sour orange *Citrus aurantium* L. flowers: A new vegetable source of milk-clotting proteases. *Lwt*, v. 54, n. 2, p. 325–330, 2013.
- MEHRNOUSH, A.; MUSTAFA, S.; YAZID, A. M. M. 'Heat-treatment aqueous two phase system' for purification of serine protease from kesinai (*Streblus Asper*) leaves. *Molecules*, v. 16, n. 12, p. 10202–10213, 2011.
- NADAR, S. S.; PAWAR, R. G.; RATHOD, V. K. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 101, p. 931–957, 2017.
- NASCIMENTO, M. B. DO et al. Equilibrium data and thermodynamic studies of α -amylase partition in aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, v. 463, p. 69–79, 2018.
- NICOSIA, F. D. et al. An Easy and Cheap Kiwi-Based Preparation as Vegetable Milk Coagulant: Preliminary Study at the Laboratory Scale. *Foods*, v. 11, n. 15, 2022.
- NASIRI E. et al. Novel milk-clotting enzyme from sour orange flowers (*Citrus aurantium* L.) as a coagulant in Iranian white cheese. *European Food Research and Technology*, v. 246, p. 139–148, 2020
- ONG, L.; ENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Original article angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. *Dairy Science and Technology*, v. 87, n. 2, p. 149-165, 2007.
- PADILHA, G. S.; OSÓRIO, W. R. Economic method for extraction/purification of a *Burkholderia cepacia* lipase with potential biotechnology application. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2019.
- PAGTHINATHAN, M. et al. Extraction, purification and characterisation of a milk-clotting

- protease from “kesinai” (*Streblus asper* Lour.) leaves. **International Food Research Journal**, v. 26, n. 3, p. 913–922, 2019.
- PEREIRA, A. S. et al. Study of alpha-amylase obtained by solid state fermentation of cassava residue in aqueous two-phase systems. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 3, p. 1141-1152, 2018.
- PILLACA-PULLO, O. S. et al. Purification of *Pseudomonas* sp. proteases through aqueous biphasic systems as an alternative source to obtain bioactive protein hydrolysates. **Biotechnology Progress**, v. 37, n. 3, p. 1–11, 2020.
- RAMAKRISHNAN, V. et al. Extraction and purification of lipase from *Enterococcus faecium* MTCC5695 by PEG/phosphate aqueous-two phase system (ATPS) and its biochemical characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 19-27, 2016.
- ROCHA, M. V. et al. A sustainable affinity partitioning process to recover papain from *Carica papaya* latex using alginate as macro-ligand. **Separation and Purification Technology**, v. 168, p. 168–176, 2016.
- SAMPAIO, V. S. et al. Partitioning behavior of lysozyme and α -lactalbumin in aqueous two-phase system formed by Ionic Liquids and Potassium Phosphate. **International Journal of Food Engineering**, v. 13, n. 10, 2017.
- SHARMA, K. M. et al. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, p. 115–126, 2017.
- SILVA, A. V. et al. Partial purification of fibrinolytic and fibrinogenolytic protease from *Gliricidia sepium* seeds by aqueous two-phase system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 27, n. June, 2020.
- SILVA, G. M. DE S. et al. Artichoke leaf extracts : Proteolytic activity , coagulant and HPLC analysis. **Science and Agrotechnology**, v. 45, p. 1981–1829, 2021.
- SILVA, O. S. et al. Partitioning and extraction protease from *Aspergillus tamarii* URM4634 using PEG-Citrate aqueous two-phase systems. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.9, p. 168-173, 2017.
- SIQUEIRA, J. G. W. et al. Extraction of protease from *Aspergillus tamarii* URM 4634 in aqueous two-phase system under continuous and discontinuous process. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 50, p. 556-563, 2020.

- SOLANKI, P. et al. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. **3 Biotech**, v. 11, n. 10, p. 1–25, 2021.
- SOUZA, R. L. et al. Aqueous two-phase systems based on cholinium salts and tetrahydrofuran and their use for lipase purification. **Separation e Purification Technology**, Aracaju, v. 155, p. 118-126, 2015.
- WU, W. et al. Single step purification of bromelain from *Ananas comosus* pulp using a polymer/salt aqueous biphasic system. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 0, p. 1–5, 2017.
- ZHU, X.; ZHANG, H. Optimization of [CnPy]Cl (n=2,4,6) ionic liquid aqueous two-phase system extraction of papain using response surface methodology with box-behnken design. **Process Biochemistry**, v. 77, n. November 2018, p. 113–121, 2019.