

**INSTITUTO FEDERAL DE ALAGOAS  
CAMPUS SATUBA  
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM LATICÍNIOS**

**JONATHAS LUIZ DE SENA SANTOS  
WELLINGTON MOREIRA DA SILVA**

**VIABILIDADE TECNOLÓGICA DE EXTRATO ENZIMÁTICO DO FRUTO DA  
MACAMBIRA (*Bromelia laciniosa* Mart. ex Schult.) COMO AGENTE  
COAGULANTE DO LEITE BOVINO**

**SATUBA - AL**

**2026**

**JONATHAS LUIZ DE SENA SANTOS  
WELLINGTON MOREIRA DA SILVA**

**VIABILIDADE TECNOLÓGICA DE EXTRATO ENZIMÁTICO DO FRUTO DA  
MACAMBIRA (*Bromelia laciniosa* Mart. ex Schult.) COMO AGENTE  
COAGULANTE DO LEITE BOVINO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Superior de Tecnologia em Laticínios do Instituto Federal de Alagoas, *Campus* Satuba, como requisito parcial para obtenção do grau de Tecnólogo em Laticínios.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Ma. Maria Aparecida de Melo Alves.

**Coorientador:** Quím. Dr. José Dilson Francisco da Silva

**SATUBA - AL**

**2026**



**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**  
**Instituto Federal de Alagoas**  
**Campus Satuba**  
**Biblioteca Benevides Valente Monte**

---

543.1

S237v Santos, Jonathas Luiz de Sena.

Viabilidade tecnológica de extrato enzimático do fruto da macambira (*Bromelia laciniosa* Mart. ex Schult.) como agente coagulante do leite bovino / Jonathas Luiz de Sena Santos, Wellington Moreira da Silva. – Dados eletrônicos (1 arquivo : 1.081 KB). – 2026.

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: Internet.

Orientação: Prof.<sup>a</sup> Ma. Maria Aparecida de Melo Alves.

Coorientador: Quím. Dr. José Dilson Francisco da Silva.

Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Laticínios) - Instituto Federal de Alagoas, *Campus Satuba*, Satuba, 2026.

1. Química analítica. 2. Análise quantitativa. 3. Bioquímica. 4. Enzimas. 5. Leite bovino – Alimentos. 6. Bromeliaceae. 7. Macambira. I. Silva, Wellington Moreira da. II. Alves, Maria Aparecida de Melo, orient. III. Silva, José Dilson Francisco da, coorientador. IV. Título.

---

**Ana Caroline de Oliveira Silva**  
**Bibliotecária - CRB-4/1832**

**JONATHAS LUIZ DE SENA SANTOS**  
**WELLINGTON MOREIRA DA SILVA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Superior de Tecnologia em Laticínios do Instituto Federal de Alagoas, *Campus* Satuba, como requisito parcial para obtenção do grau de Tecnólogo em Laticínios.

Aprovado em: 05 / 02 / 2026.

**Orientadora:**



Documento assinado digitalmente  
**MARIA APARECIDA DE MELO ALVES**  
Data: 09/02/2026 11:55:44-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof.<sup>a</sup> Ma. Maria Aparecida de Melo Alves  
Instituto Federal de Alagoas - Ifal (Campus Satuba)

**Coorientador:**



Documento assinado digitalmente  
**JOSE DILSON FRANCISCO DA SILVA**  
Data: 09/02/2026 12:01:27-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Quím. Dr. José Dilson Francisco da Silva  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

**Banca examinadora:**



Documento assinado digitalmente  
**VANUSIA AMORIM PEREIRA DOS SANTOS**  
Data: 09/02/2026 12:21:17-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Vanusia Amorim Pereira dos Santos  
Instituto Federal de Alagoas - Ifal (Campus Satuba)



Documento assinado digitalmente  
**NORMA CANDIDA DOS SANTOS AMORIM**  
Data: 12/02/2026 11:57:33-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Norma Candida dos Santos Amorim  
Instituto Federal de Alagoas - Ifal (Campus Satuba)

Dedico este trabalho aos meus primeiros e queridos professores, meus pais, Maria Silvana de Sena Santos e Josué Luiz dos Santos, que, com dedicação e esforços constantes, me proporcionaram os bens mais valiosos da minha vida: minha ética, moral e educação.

**Por Jonathas Luiz de Sena Santos**

Desde os primeiros sonhos em seguir a área de alimentos, carreguei comigo o desejo de compreender, transformar e valorizar cada detalhe que compõe o universo dos alimentos. Este trabalho representa não apenas uma conquista acadêmica, mas a realização de um propósito construído com esforço, disciplina e paixão pela ciência e tecnologia dos alimentos.

Dedico este trabalho a Deus, por me conceder força, sabedoria e serenidade em cada etapa desta caminhada. Aos meus pais, pelo amor incondicional, pelos conselhos e por acreditarem em mim mesmo nos momentos mais desafiadores. Aos meus professores e colegas, que contribuíram com conhecimento, incentivo e amizade ao longo desta jornada. E, especialmente, a mim mesmo, por não desistir dos meus sonhos e por transformar cada obstáculo em aprendizado.

Hoje, ao concluir o curso de Tecnologia em Laticínios, sinto que cada esforço valeu a pena. Este é mais do que um fim de ciclo — é o início de uma nova fase em direção às pesquisas, áreas nas quais desejo continuar contribuindo para o desenvolvimento e a inovação no setor de alimentos.

**Por Wellington Moreira da Silva**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu Deus, por me sustentar em meio às adversidades.

Aos meus amados pais, Maria Silvana de Sena Santos e Josué Luiz dos Santos, pelo carinho, apoio e por estarem sempre comigo. Por cuidarem de mim da melhor forma possível e me incentivarem a ir em busca dos meus maiores sonhos.

À minha querida instituição, Campus Satuba, por me proporcionar uma educação gratuita e de qualidade, e pelos momentos mais emocionantes que levarei para toda a minha vida.

À Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PRPPI) do Instituto Federal de Alagoas, em razão do apoio financeiro a este trabalho, realizado por meio dos Programas Institucionais de Iniciação Científica e Tecnológica.

Agradeço a todos os professores e técnicos do Campus Satuba, com quem tive a oportunidade de aprender constantemente ao longo desta caminhada.

Agradeço em especial à minha orientadora, professora e amiga, Prof.<sup>a</sup> Maria Aparecida de Melo Alves, por estar presente em grandes decisões da minha trajetória, nas viagens, risadas, “puxões de orelha” e reflexões sobre a vida. Minha eterna gratidão, sobretudo, na condução fundamental para a concretização deste trabalho.

Ao meu coorientador, José Dilson Francisco da Silva, agradeço todo o suporte, disponibilidade, orientação e a amizade construída. Sou grato também por se fazer presente em um marco fundamental na minha vida. Gratidão.

Aos meus grandes e excelentíssimos professores, Vanusia Amorim Pereira dos Santos, Norma Cândida dos Santos Amorim e Nelson Augusto do Nascimento Junior. Agradeço por estarem presentes em bons momentos da minha vida acadêmica e pessoal. Sou grato pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade, orientação e conselhos recebidos.

Ao meu companheiro de trabalho, Wellington Moreira da Silva, pela colaboração essencial, momentos de discussões relevantes e amizade construída ao longo deste processo.

Aos meus queridos amigos, Sanderson Lino e Gabriel Paulino, por me proporcionarem a verdadeira amizade e bons momentos compartilhados durante essa trajetória.

Gratidão à minha grande amiga Ana Patrícia Euzébio Magalhães, por ser minha companheira de turma durante toda essa jornada.

À minha companheira de trajetória, Lívia de Abreu Silva, por sempre apoiar minhas pequenas e grandes decisões.

Ao meu grande amigo, seu Edimilson Godoy, mais conhecido como “Primo”, pelas sábias palavras e abraços sinceros durante toda a passagem pelo Campus Satuba.

Ao Sr. Lailson e à sua esposa Rosicleide, motorista e monitora da rota Atalaia – Satuba, pela dedicação e empenho em prol da educação de diversos jovens, inclusive a minha.

Ao meu grande amigo, Seu Paulo. Minha gratidão pelo apoio, disponibilidade e conhecimentos compartilhados.

Ao pequeno garoto que um dia falava que iria estudar no Campus Satuba, e hoje está em processo de formação. Gratidão ao meu “eu” do passado, que me permitiu estar aberto a viver novas experiências.

Por fim, sou grato a todas as “pedras” encontradas ao longo do caminho, que, ao revelarem suas próprias limitações, contribuíram para o meu amadurecimento pessoal e acadêmico. A elas, minha gratidão: hoje estou aqui.

**Por Jonathas Luiz de Sena Santos**

A Deus, por me conceder força, sabedoria e perseverança para enfrentar cada desafio com fé e esperança ao longo desta caminhada.

Aos meus pais, Adeildo José da Silva e Maridalva Moreira da Silva, pelo amor incondicional, pela paciência e pelo apoio constante em todos os momentos desta trajetória. Vocês foram e sempre serão a base da minha vida e o alicerce que me sustentou até aqui.

Aos meus professores do curso de Tecnologia em Laticínios, pela dedicação, pelo compartilhamento de conhecimentos e por despertarem em mim o desejo de continuar contribuindo com a ciência e a inovação na área de alimentos.

Ao Instituto Federal de Alagoas – Campus Satuba, pela oportunidade de crescimento acadêmico, técnico e humano, e por ser o espaço onde muitos dos meus sonhos começaram a se tornar realidade.

Aos colegas e amigos de curso, pela parceria, pelas risadas, pelas longas horas de estudo e por cada aprendizado compartilhado ao longo dessa jornada.

Ao meu companheiro de trabalho, Jonathas Luiz de Sena, pelo apoio, incentivo e colaboração diária, fundamentais para tornar essa caminhada mais leve e significativa.

Ao meu noivo, Ricardo Correia Souto, pelo amor, compreensão, paciência e apoio incondicional, especialmente nos momentos mais desafiadores. Sua presença e incentivo foram essenciais para que eu seguisse firme na realização deste sonho.

Por fim, agradeço a mim mesmo por acreditar, persistir e jamais desistir do propósito que me trouxe até aqui. Esta conquista é resultado de cada esforço, de cada noite de estudo e do amor pela profissão que escolhi seguir.

**Por Wellington Moreira da Silva**

*“Se vi mais longe, foi por estar de pé  
sobre ombros de gigantes.”*

*(Isaac Newton)* **(Por Jonathas Luiz de  
Sena Santos)**

“Sou como você me vê. Posso ser leve  
como uma brisa ou forte como uma  
ventania, depende de quando e como você  
me vê passar.”

LISPECTOR, Clarice. A descoberta do  
mundo. **(Por Wellington Moreira da  
Silva)**

Rio de Janeiro: Rocco, 1999.

## RESUMO

A macambira (*Bromelia laciniosa* Mart. ex Schult.) é uma espécie de planta nativa do semiárido brasileiro e pertence à família *Bromeliaceae*, do mesmo grupo do abacaxi (*Ananas comosus*). A planta possui vasta importância regional devido às suas aplicabilidades ornamentais, alimentícias, cercas vivas, produção de fibras e enzimas. Estudos sobre a aplicabilidade de enzimas do fruto da macambira como coagulante no leite bovino ainda são incipientes. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a aplicabilidade de extrato enzimático (EEM) dos frutos da macambira como coagulante do leite bovino. A atividade enzimática do EEM foi avaliada por meio de ensaios *in vitro*, avaliando-se a influência do pH (5 a 9), temperatura ótima (30 a 90 °C), além da determinação de parâmetros cinéticos  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) e  $V_{max}$  (velocidade máxima), utilizando azocaseína como substrato. Na etapa seguinte, parâmetros ótimos, como: atividade enzimática (U), rendimento (U/Kg de fruto) e pureza (%), foram determinados para a obtenção do preparado enzimático. O potencial de coagulação do leite pelo extrato enzimático otimizado (EEBM) foi avaliado *in situ* (leite bovino pasteurizado), a partir da determinação do poder coagulante e da estabilidade da atividade enzimática durante o armazenamento. O EEM apresentou atividade proteolítica ótima em pH 7,0 e temperatura de 70 °C. No entanto, entre 30-40 °C (início da atividade proteolítica), apresentou-se compatibilidade com a temperatura tradicionalmente adotada na fabricação de queijos. Quanto aos parâmetros cinéticos, o  $K_m$  igual a 0,122 g/100 mL e  $V_{max}$  (5,17 U/min). O EEBM (temp = 35 °C; razão fruto/tampão = 1:1 p/v) apresentou atividade coagulante 533 U/ml, confirmando sua viabilidade de aplicação na fabricação de queijos. Quanto à estabilidade enzimática, o EEBM manteve sua atividade durante 50 dias de armazenamento. Estudos posteriores são necessários visando verificar as condições dessas possíveis aplicações.

Palavras-chave: Caatinga; cinética; enzimas vegetais; proteases; queijos.

## ABSTRACT

Macambira (*Bromelia laciniosa* Mart. ex Schult.) is a plant species native to the Brazilian semi-arid region belonging to the *Bromeliaceae* family, the same group as the pineapple (*Ananas comosus*). This plant holds vast regional importance due to its applications in ornamentation, food, living fences, and the production of fibers and enzymes. Studies on the application of macambira fruit enzymes as a coagulant in bovine milk remain limited. This research aimed to evaluate the applicability of the enzymatic extract (EEM) from macambira fruits as a bovine milk coagulant. The enzymatic activity of the EEM was assessed via *in vitro* assays, evaluating the influence of pH (5 to 9) and temperature (30 to 90 °C), in addition to determining kinetic parameters, such as  $K_m$  (Michaelis-Menten constant) and  $V_{max}$  (maximum velocity), using azocasein as a substrate. Subsequently, optimal parameters such as enzymatic activity (U), yield (U/kg of fruit), and purity (%) were determined to obtain the optimized enzymatic preparation. The milk coagulation potential of the optimized enzymatic extract (EEBM) was evaluated *in situ* (pasteurized bovine milk) by determining the milk-clotting activity and enzymatic stability during storage. The EEM showed optimal proteolytic activity at pH 7.0 and 70 °C. However, the 30–40 °C range proved compatible with temperatures traditionally adopted in cheesemaking. Regarding kinetic parameters,  $K_m$  was 0.122 g/100 mL and  $V_{max}$  was 5.17 U/min. The EEBM (at 35 °C; fruit/buffer ratio = 1:1 w/v) presented a milk-clotting activity of 533 U/mL, confirming its viability for cheese production application. Regarding enzymatic stability, the EEBM maintained its activity for 50 days of storage. Further studies are required to verify the conditions for these potential applications.

Keywords: Caatinga; kinetics; plant enzymes; proteases; cheese.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturação da micela de caseína. ....	17
Figura 2 – Representação esquemática do mecanismo de coagulação ácida.....	18
Figura 3 – Representação da ação enzimática (quimosina) na $\kappa$ -caseína. ....	19
Figura 4 – A) Frutos da macambira; B) Ponto de coleta amostral; C) Empacotamento dos frutos para envio aéreo.....	23
Figura 5 – Fluxograma metodológico do processo de extração e caracterização das enzimas (atividade enzimática e parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{max}$ ) presentes na macambira.....	24
Figura 6 – A) Tonalidades coletadas do fruto da macambira; B) Processo metodológico para obtenção do EEBM. ....	25
Figura 7 – Avaliação da atividade proteolítica in situ.....	26
Figura 8 – EEBM para verificação da ação coagulante no período de 50 dias. ....	27
Figura 9 – Efeito do pH sobre a atividade proteolítica.....	28
Figura 10 – Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica. ....	29
Figura 11 – Atividade enzimática em relação ao substrato azocaseína.....	30
Figura 12 – Gráfico de Lineweaver-Burk.....	30
Figura 13 – Verificação da ação coagulante do EEBM sob congelamento durante o período de 50 dias.....	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Influência da razão solvente/fruto na atividade enzimática, rendimento e pureza dos extratos (n = 3). .....	31
Tabela 2 – Verificação da ação coagulante das diferentes tonalidades do fruto da macambira com leite pasteurizado (n = 3). .....	32

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>15</b>
<b>3.1</b>	<b>Leite</b>	<b>15</b>
<b>3.2</b>	<b>Bioquímica das proteínas do leite</b>	<b>16</b>
<b>3.3</b>	<b>Enzimas coagulantes utilizados no leite: animal, microbiano e vegetal</b>	<b>19</b>
3.3.1	Enzimas coagulantes de origem animal	19
3.3.2	Enzimas coagulantes microbianas	20
3.3.3	Enzimas coagulantes de origem vegetal	20
<b>3.4</b>	<b>Prospecção de novas enzimas coagulantes para a fabricação de queijos</b>	<b>21</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>22</b>
<b>4.1</b>	<b>Obtenção do fruto (<i>Bromelia laciniosa</i> Mart. ex Schult.)</b>	<b>22</b>
<b>4.2</b>	<b>Caracterização <i>in vitro</i> da atividade enzimática do extrato enzimático</b>	<b>23</b>
4.2.1	Determinação de parâmetros ótimos para a extração de proteases dos frutos de macambira	26
<b>4.3</b>	<b>Avaliação do poder coagulante do extrato enzimático no leite</b>	<b>25</b>
<b>4.4</b>	<b>Estabilidade da atividade enzimática do extrato enzimático durante o tempo de armazenamento</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>28</b>
<b>5.1</b>	<b>Caracterização <i>in vitro</i> da atividade enzimática do extrato enzimático</b>	<b>28</b>
<b>5.2</b>	<b>Determinação de parâmetros ótimos para a extração de proteases de frutos de macambira</b>	<b>31</b>
<b>5.3</b>	<b>Avaliação do poder coagulante do extrato enzimático no leite</b>	<b>31</b>
<b>5.4</b>	<b>Estabilidade da atividade enzimática do extrato enzimático durante o tempo de armazenamento</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>34</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>35</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O leite é uma combinação de diversos componentes (água, proteínas, lipídios, carboidratos, sais minerais e vitaminas) (Vidal; Saran Netto, 2018), oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em boas condições higiênicas, de vacas saudáveis, com uma boa alimentação e bem-estar animal (Brasil, 2018). Sobretudo, é nutritivo e amplamente consumido, quer seja na forma *in natura* (fluido) ou por meio de diversos derivados lácteos (Silva *et al.*, 2012), com destaque para produção de queijos.

A fabricação de queijos é caracterizada por um processo tecnológico de precipitação das diferentes frações proteicas, geralmente das caseínas. Esse processo é realizado por diferentes métodos físico-químicos, principalmente a partir do uso de coagulantes enzimáticos; estes atuam modificando a superfície das micelas de caseínas, induzindo a coagulação e possibilitando a elaboração de diferentes tipos de queijos produzidos ao redor do mundo (Santos, 2023). Quanto à origem, os coagulantes podem ser obtidos a partir de diferentes fontes: animal, microbiana e vegetal. O coalho de origem animal, extraído do estômago de ruminantes lactentes, tem sido utilizado há séculos na indústria queijeira, sendo composto predominantemente pelas enzimas quimosina e/ou pepsina (Liu *et al.*, 2021; De Jesus, 2023). Por sua vez, o coagulante microbiano é obtido por meio de microrganismos, em sua maioria, geneticamente modificados (Leite Júnior; Vieira, 2021). Em relação ao coagulante vegetal, este apresenta-se vantajoso, tendo em vista a sua obtenção natural, extraído majoritariamente de folhas, frutos e sementes (Silva Neto *et al.*, 2023; Litrenta *et al.*, 2024; Lima Guimarães *et al.*, 2024; Yasmin *et al.*, 2025).

Com o aumento do consumo de queijos, restrições alimentares (religiosas e veganas, por exemplo) e tendências de consumo voltadas à sustentabilidade (Manuelian *et al.*, 2020; Halicka *et al.*, 2025), bem como à preferência por alimentos livres de organismos geneticamente modificados (Peschel *et al.*, 2019; Drugova *et al.*, 2020; Adalja *et al.*, 2023), tem-se buscado por novas fontes naturais de enzimas coagulantes (Akçay *et al.*, 2025). O uso de enzimas de origem vegetal surge como uma importante alternativa, pois elas são obtidas a partir de recursos naturais e oferecem uma alternativa aos coagulantes convencionais (Litrenta *et al.*, 2024). Dessa maneira, explorar essas alternativas pode fomentar a sustentabilidade no setor lácteo

(Alvarenga *et al.*, 2023), ao minimizar significativamente a dependência por coagulantes de origem animal e, também, os custos de produção.

Estudos conduzidos por Rodrigues e Laguna (2001) indicaram que extratos enzimáticos vegetais obtidos de plantas da flora nordestina apresentaram resultados promissores com ação coagulante no leite de diferentes matrizes (caprina e bovina). Ademais, diferentes investigações têm avaliado o emprego de extratos vegetais como alternativas tecnológicas ao coalho de origem animal (Adetunji; Salawu, 2008; Ben Amira *et al.*, 2017; Rincón *et al.*, 2017; Almeida *et al.*, 2018), evidenciando o interesse científico na descoberta de coagulantes alternativos.

A Macambira (*Bromelia laciniosa* Mart. ex Schult.) é uma planta da família das Bromeliáceas, do gênero Bromélia e caracteriza-se por produzir frutos do tipo baga, em formato tricarpelar, apresentando de 3 a 5 cm de comprimento e diâmetro variando entre 1 a 2 cm. À medida que se desenvolve, a coloração das bagas sofre alterações, apresentando tons amarelados, roxos ou cor de vinho (Dutra *et al.*, 2010).

A planta é encontrada no semiárido do Nordeste brasileiro (De Souza *et al.*, 2021), constituindo uma importante fonte de alimentação animal e consumo humano, especialmente durante longos períodos de seca, sendo extraída da base das folhas uma massa utilizada na produção de um tipo de pão (Lima-Saraiva *et al.*, 2012). Paralelamente, apresenta outras versatilidades, sendo elas ornamentais, produção de fibras e enzimas (Leme; Marigo, 1993). Pesquisas avaliando o potencial de extratos obtidos dos frutos desta planta como coagulante do leite bovino ainda não foram reportadas pela comunidade científica. Desta forma, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a aplicabilidade de extrato enzimático (EEM) dos frutos da macambira como coagulante do leite bovino.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar a aplicabilidade de extrato enzimático dos frutos da macambira como coagulante do leite bovino.

## 2.2 Específicos

- Caracterizar, usando métodos *in vitro*, a atividade enzimática do extrato enzimático quanto ao pH, temperatura ótima e parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{max}$ );
- Determinar parâmetros ótimos de extração das proteases dos frutos de macambira;
- Avaliar o poder coagulante do extrato enzimático no leite bovino;
- Verificar a estabilidade da atividade enzimática do extrato durante o tempo de armazenamento.

## 3 REFERENCIAL TEÓRICO

### 3.1 Leite

O leite bovino é um produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta realizada em condições higiênicas, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas (Brasil, 2018). Sendo versátil, pode ser consumido na sua forma original (pasteurizado), ele também serve como fonte de matéria-prima em diversos tipos de produtos, entre alimentos doces e derivados salgados, originando-se os diferentes tipos de queijos (Siqueira, 2019).

De acordo com Silva *et al.* (2012), a composição química do leite bovino apresenta um elevado percentual de água ( $\cong 87,5\%$ ), complementado por gordura (3,5%), proteínas (3,5%), carboidratos (4,7%) e sais minerais (0,8%). Nota-se que tais teores não representam valores fixos, mas sim médias suscetíveis a oscilações. Essas variabilidades ocorrem em função da raça (Girolando, Gir, Jersey e Holandesa), estágio de lactação, alimentação, sanidade animal, idade e sazonalidade climática. No contexto industrial, essa variabilidade é crucial, uma vez que, quanto maior o percentual de extrato seco total (EST), maior será o rendimento final dos produtos elaborados.

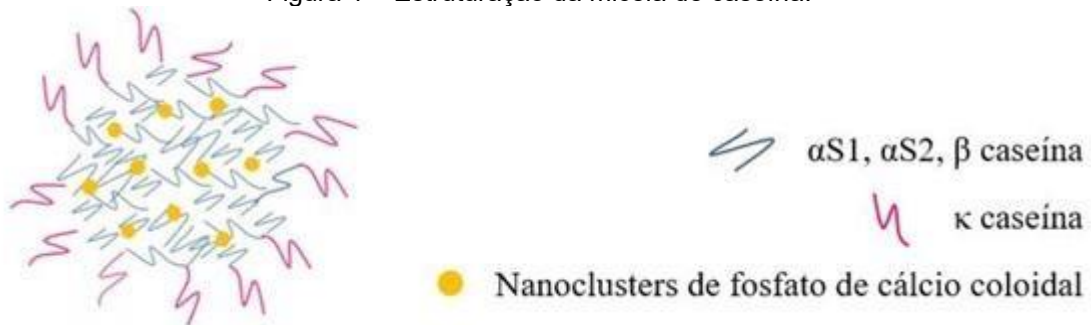
A matriz láctea é uma das *commodities* com alta relevância no panorama global, tanto no contexto produtivo quanto no consumo, estando presente na base alimentar de bilhões de pessoas diariamente. Esse alimento é amplamente reconhecido por sua elevada densidade nutricional (fonte de proteínas de alto valor biológico, cálcio e vitaminas), nutrientes fundamentais em diferentes fases da vida (Richards, 2020; Siqueira, 2021). Com relação ao contexto econômico e industrial, a cadeia produtiva do leite destaca-se como um setor de elevada relevância socioeconômica no Brasil, movimentando cerca de R\$ 100 bilhões ao ano (Siqueira, 2021). Diante desse setor tão versátil e inovador, o EEM aplicado ao leite possibilita uma alternativa tecnológica promissora, agregando valor cultural e mercadológico.

### **3.2 Bioquímica das proteínas do leite**

Devido à sua elevada complexidade estrutural e composicional, o leite constitui um sistema biológico dinâmico, no qual diversas reações físico-químicas, bioquímicas e microbiológicas ocorrem de forma simultânea, resultantes da interação entre seus diversos constituintes (Oliveira, 2022; Thaler Neto *et al.*, 2022). Nesse contexto, as proteínas do leite possuem elevado interesse científico e industrial, sendo compostas majoritariamente por dois grupos distintos: as caseínas ( $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseína) representando cerca de 80% do conteúdo proteico total. Em relação aos 20% restantes, mas não menos importantes, integram as proteínas do soro: beta-lactoglobulina e alfa-lactoalbumina, ambas com alto valor biológico (Panetto *et al.*, 2024).

As caseínas são caracterizadas por serem proteínas fosforiladas, de estrutura aberta e flexível, organizadas principalmente na forma de micelas de caseína (MC). Estruturalmente, essas MC incorporam, além da fração proteica, água e uma significativa proporção de minerais, predominantemente na forma de fosfato de cálcio coloidal (FCC) (Silva *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2023), como demonstrado na Figura 1.

Figura 1 – Estruturação da micela de caseína.



Fonte: Do Valle *et al.*, 2022.

A estabilidade das MC é assegurada, em grande parte, pela presença da κ-caseína em sua camada externa; por ser a fração mais hidrofílica e insensível ao cálcio, ela atua como uma barreira protetora, diferentemente das frações internas (αs1-, αs2-, β-caseínas). Estas últimas interagem com aglomerados de FCC, que atuam como “cimento” em suas interligações estruturais. No entanto, os principais fatores que afetam sua estabilidade são de natureza físico-química e biológica, com destaque para: alterações de pH e temperatura, a hidrólise enzimática da κ-caseína, adição de ácidos orgânicos e o excesso da concentração de cálcio iônico ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Silva *et al.*, 2019; Freitas *et al.*, 2021).

Para a indústria, o monitoramento do pH e da temperatura é uma etapa crucial na recepção da matéria-prima; o leite com pH inferior a 6,2 pode apresentar estabilidade térmica comprometida, devido ao aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  na fase aquosa, resultante da solubilização do FCC. Essa alteração eleva as chances de precipitação proteica indesejada durante o tratamento térmico (pasteurização) (Conti; Santos, 2009), etapa obrigatória no início do beneficiamento do leite (Brasil, 1969). Entretanto, sob condições controladas, os parâmetros citados tornam-se aliados fundamentais na elaboração de diversos derivados lácteos, inclusive queijos (Vidal; Saran Netto, 2018).

Na fabricação de queijos, ocorre o processo de desestabilização das MC, primordialmente, por dois mecanismos distintos: a coagulação ácida e a coagulação enzimática. A coagulação ácida ocorre da ação de bactérias ácido-láticas, naturalmente presentes no leite (Ramon; Silva, 2019; Tesfaw *et al.*, 2024) ou ainda por adição de ácidos orgânicos de grau alimentício (Fox *et al.*, 2017). Neste processo, o pH diminui até atingir 4,6 (ponto isoelétrico das MC), ocorrendo um aumento de cargas positivas (íons  $\text{H}^+$ ), que ao interagir com as cargas negativas presentes na

superfície das MC, provoca a desestabilização e agregação dessas estruturas (Figura 2), assim, formando uma rede de caseína induzida pela acidificação, resultando em um agregado de caseína denominado "gel". A coalhada obtida por esse mecanismo (ácido) é altamente porosa, frágil e difícil de dessoragem (baixa sinérese). Tais propriedades resultam na produção de queijos com alta umidade e massa mole, como o Queijo *Cottage*, *Cream Cheese*, *Queso Blanco* e *Paneer* (Souza *et al.*, 2023; Garcia *et al.*, 2024).

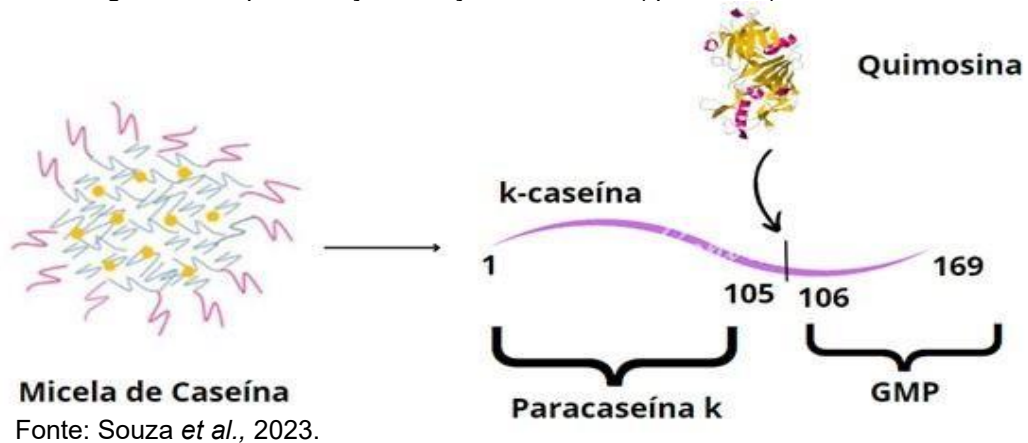
Figura 2 – Representação esquemática do mecanismo de coagulação ácida.



Fonte: Souza *et al.*, 2023.

A coagulação enzimática, por sua vez, fundamenta-se predominantemente na ação de proteases sobre as micelas de caseína (Fox *et al.*, 2017). Na elaboração de queijos, as proteases mais utilizadas (quimosina e/ou pepsina) destacam-se como as principais enzimas coagulantes. Devido à sua elevada especificidade pela  $\kappa$ -caseína, a quimosina catalisa a hidrólise da ligação peptídica entre os aminoácidos fenilalanina (Phe105) e metionina (Met106) (Figura 3). Essa clivagem resulta na liberação da porção hidrofílica (glicomacropéptido) para o soro, acarretando a diminuição da repulsão estérica e eletrostática. Conseqüentemente, as MC se desestabilizam e se agregam, formando o coágulo enzimático (Souza *et al.*, 2023; Garcia *et al.*, 2024). Além desse processo, emprega-se a coagulação mista (ácido + enzima), que depende intrinsecamente do pH e temperatura do meio (Tarapata *et al.*, 2021).

Figura 3 – Representação da ação enzimática (quimosina) na  $\kappa$ -caseína.



Ressalta-se que o  $\text{Ca}^{2+}$  desempenha papel crucial nessa etapa, pois atua formando pontes (ligações cruzadas) entre as MC, proporcionando a formação de um coágulo firme e elástico (Furtado, 2019), estruturalmente distinta do gel resultante na coagulação acidifica. Nota-se que o uso de enzimas ocorre em cerca de 75% dos queijos até então catalogados (Fox *et al.*, 2017), demonstrando a relevância das proteases na cadeia produtiva de queijos. Nesse cenário, figuram o Queijo Coalho, *Parmigiano-Reggiano*, *Mozzarella* e *Roquefort* (Nassu *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2024), dentre diversas outras variedades.

No que tange às diferenças sensoriais entre as vias de coagulação ácida ou enzimática, destaca-se o impacto na textura final do produto elaborado. A coagulação ácida apresenta géis macios e friáveis, com acidez perceptível. Em contrapartida, a via enzimática promove a formação de uma estruturação mais resistente e elástica, viabilizando o fatiamento e possibilitando a integridade reológica adequada ao longo da maturação (Fox *et al.*, 2017; Garcia *et al.*, 2024).

### 3.3 Enzimas coagulantes utilizados no leite: animal, microbiano e vegetal

#### 3.3.1 Enzimas coagulantes de origem animal

O coalho de origem animal, extraído do estômago de ruminantes lactentes, tem sido utilizado há séculos na indústria queijeira, é composto predominantemente pelas enzimas quimosina e/ou pepsina (Liu *et al.*, 2021; De Jesus, 2023). Com a expansão da produção queijeira e o aumento proporcional de seu consumo, impulsionou a

utilização desse agente (coalho animal). Por conseguinte, têm sido observadas limitações relacionadas na sua oferta, devido à baixa disponibilidade de animais jovens para o abate (Souza *et al.*, 2024), os quais se mostram insuficientes no suprimento da elevada demanda industrial.

### 3.3.2 Enzimas coagulantes microbianas

Os coagulantes de origem microbiana são obtidos por meio de microrganismos, boa parte geneticamente modificados, visando à produção de enzimas com elevada atividade coagulante (Leite Júnior; Vieira, 2021), sendo uma das alternativas ao coalho de origem animal, especialmente em usos de larga escala industrial. Entre as enzimas microbianas, destacam-se as proteases aspárticas produzidas por fungos das espécies *Rhizomucor miehei* e *Rhizomucor pusillus*, ambos pertencentes ao gênero *Rhizomucor*. Além dessas, também se encontram os coagulantes produzidos por fermentação, em que se empregam os microrganismos *Kluyveromyces marxianus* var. *Lactis* e *Aspergillus niger* var. *Awamori*. Estes últimos apresentam estrutura tridimensional semelhante à da quimosina, o que lhes confere especificidade para a clivagem da ligação entre os aminoácidos Phe105-Met106 da  $\kappa$ -caseína (Sousa, 2022; Santos, 2023; Souza *et al.*, 2023).

### 3.3.3 Enzimas coagulantes de origem vegetal

O uso de coagulantes vegetais configura-se como uma alternativa estratégica aos agentes de origem animal e microbiana. Essa substituição demonstra potencial de atender às crescentes demandas por produtos mais naturais (Litrenta, *et al.*, 2024; Akçay *et al.*, 2025). Um dos coagulantes de origem vegetal tradicionalmente usados na fabricação de queijos provém da flor do cardo (*Cynara cardunculus*), tradicionalmente utilizada na fabricação do queijo Serra da Estrela (Inácio *et al.*, 2023). A elaboração deste queijo baseia-se na ação das cardosinas, enzimas extraídas da flor, cuja atividade proteolítica durante a maturação resulta em um produto com as características: pasta semimole, textura amanteigada, coloração branca a levemente amarelada e poucas ou nenhuma olhadura, conferindo ao queijo uma identidade

sensorial e tecnológica distinta em relação a outros queijos produzidos mundialmente (Rampanti *et al.*, 2022; Inácio *et al.*, 2023; Rocha *et al.*, 2023).

Diversas outras enzimas vegetais apresentaram elevada atividade proteolítica, como a papaína do mamão (*Carica papaya*), a bromelina do abacaxi (*Ananas comosus*) e coagulantes de origem vegetal proveniente da figueira (*Ficus carica*) (Gouvêa, 2018). Autores, como Litrenta *et al.* (2024) e Lima Guimarães *et al.* (2024) evidenciaram o potencial tecnológico de outras enzimas de origem vegetal como alternativas viáveis à quimosina de origem animal, destacando-se a actinidina do kiwi (*Actinidia deliciosa*), e a proteinase aspártica presente nas sementes de girassol (*Helianthus annuus*), sendo utilizado leite proveniente de diferentes matrizes (ovino, bovino e caprino) na elaboração de queijos.

### **3.4 Prospecção de novas enzimas coagulantes para a fabricação de queijos**

Comercialmente, são encontrados principalmente coagulantes de origem bovina e microbiana (Leite Júnior; Vieira, 2021). No entanto, estudos apontam modificações no perfil de consumo, associadas a restrições alimentares em razões religiosas (como no judaísmo e no islamismo), nutricionais (vegetarianismo) e/ou a tendências voltadas à sustentabilidade, bem como à preferência por alimentos livres de organismos geneticamente modificados (Peschel *et al.*, 2019; Manuelian *et al.*, 2020; Drugova *et al.*, 2020; Adalja *et al.*, 2023; Halicka *et al.*, 2025). Esse cenário evidencia a importância de se pesquisar novas fontes naturais de enzimas com potencial coagulante para uso na fabricação de queijos (Akçay *et al.*, 2025).

Embora estudos demonstrem a potencialidade de diversas enzimas vegetais com mecanismo de ação coagulante no leite, muitas delas apresentam limitações tecnológicas em decorrência da alta taxa de hidrólise e falta de especificidade, como consequência, a maioria confere ao queijo um sabor amargo (Farias, 2016), sendo uma exceção aos extratos derivados das flores do cardo (*Cynara cardunculus* e *Cynara humilis*), como relatado anteriormente (Egito *et al.*, 2007). Além dessas, destaca-se o uso de folhas e frutos da planta *Withania coagulans*, pertencente à família das Solanaceae (Yasmin *et al.*, 2025).

Estudos anteriores identificaram enzimas nos frutos de macambira, que podem ser uma importante fonte de coagulantes enzimáticos, ainda não avaliados (Silva *et*

*al.*, 2022; Silva *et al.*, 2024). A macambira é uma planta que pertence à família *Bromeliaceae*, assim como o abacaxi (*Ananas comosus*). A planta produz um fruto do tipo baga, de formato tricarpelar, com comprimento entre 3 e 5 cm e diâmetro variando de 1,0 a 2,0 cm. Conforme a decorrência do seu estágio de maturação, o fruto adquire tons amarelados, e suas estruturas (primária e secundária) podem apresentar tonalidades roxas ou vinho (Dutra *et al.*, 2010).

A família *Bromeliaceae*, pertencente à classe das monocotiledôneas (Luther, 2006), é composta por aproximadamente 84 gêneros (dos quais cerca de 80% ocorrem em território brasileiro) e abriga cerca de 3.827 espécies descritas (Gouda *et al.*, cont. atualizado). Essa família se destaca por sua ampla variabilidade de hábitos, tamanhos, tonalidades e potencialidades de uso, abarcando aplicações ornamentais, alimentícias, cercas vivas, produção de fibras e enzimas, além de possuir grande importância no âmbito da biodiversidade ecológica (Leme; Marigo, 1993).

Estima-se que, do total de espécies (3.827), em torno de 40% estão presentes no Brasil, tornando-o o maior país em termos de diversidade dessa família (Leme, 1997). Especificamente, apresenta três subfamílias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae (Smith; Downs, 1974; Benzing, 2000). Nesta última, encontra-se a macambira (*Bromelia laciniosa* Mart. ex Schult), endêmica da região Nordeste do Brasil (De Souza *et al.*, 2021) e principal fonte de estudo desta pesquisa.

Bruno *et al.* (2010) investigaram a ação coagulante do leite por extrato bruto do fruto verde de *Bromelia hieronymi* Mez. Os resultados obtidos foram promissores, com a formação do gel em aproximadamente 10 min após a inoculação do extrato. Tais achados evidenciam que a utilização dos frutos da respectiva bromélia promoveu uma reação enzimática eficiente para a obtenção de um coágulo firme, sem atividade proteolítica excessiva, característica que favorece o uso dessas matrizes vegetais na fabricação de queijos. Ademais, esses dados fundamentam a investigação do potencial enzimático da *Bromelia laciniosa* Mart. ex Schult., uma vez que integra a mesma família botânica e gênero da espécie estudada por Bruno *et al.* (2010).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção do fruto (*Bromelia laciniosa* Mart. ex Schult.)**

Os frutos de macambira (Figura 4-A) foram coletados no município de Canapi-AL, localizados nas coordenadas geográficas -9.076405, -37.547232 (aplicativo GPS Tools). Em seguida, foram levados ao laboratório de análise sensorial do Campus Satuba, sendo congelados até o dia de uso (Figura 4-B). Parte dos frutos foram enviados (Figura 4-C) aos laboratórios do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em parceria com o Instituto Federal de Alagoas (IFAL) – Campus Satuba, para prosseguir uma etapa das análises físico-químicas: caracterização *in vitro* da atividade enzimática do extrato (pH, temperatura, absorvância), sendo definidas condições ótimas de atuação e extração das enzimas presentes no fruto.

Figura 4 – A) Frutos da macambira; B) Ponto de coleta amostral; C) Empacotamento dos frutos para envio aéreo.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2025.

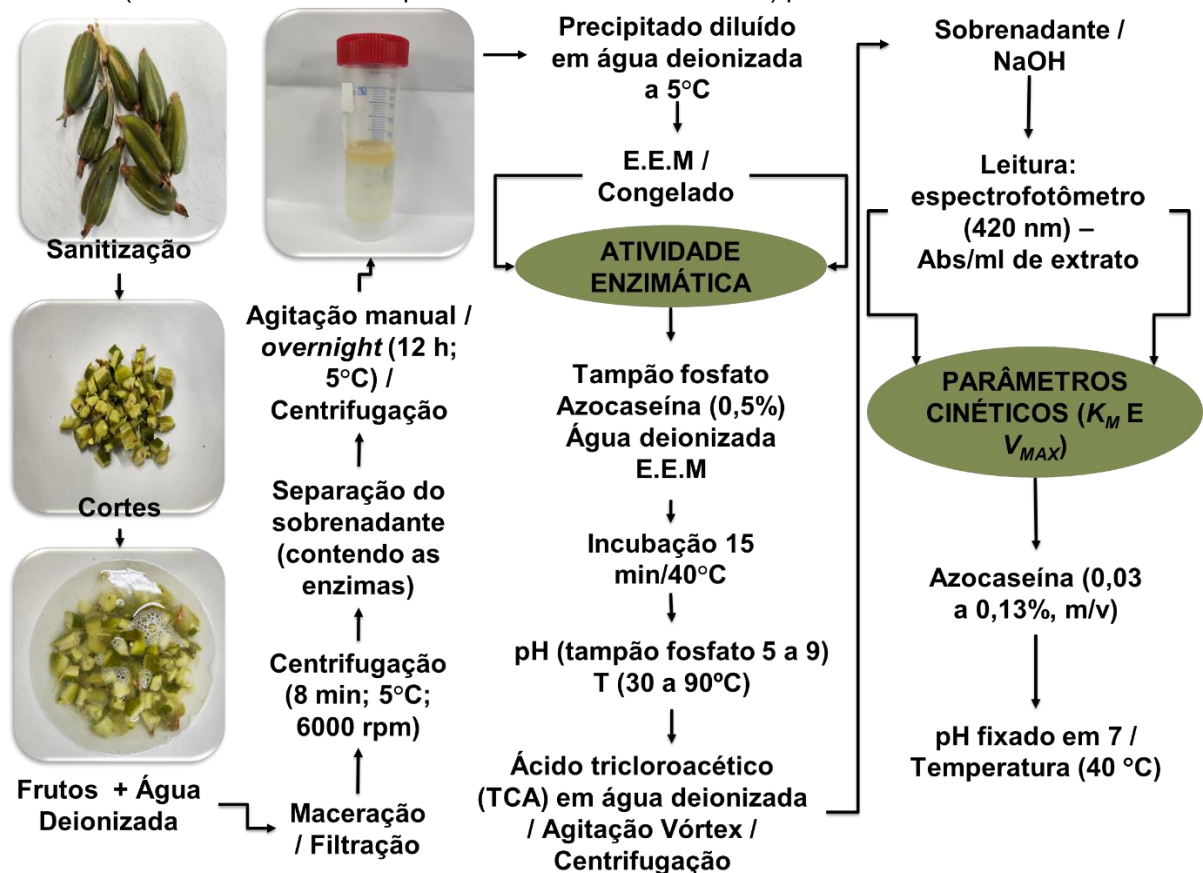
#### 4.2 Caracterização *in vitro* da atividade enzimática do extrato enzimático

A caracterização *in vitro* ocorreu nas dependências dos laboratórios do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da UFSM em parceria com o Campus Satuba. Conforme a metodologia descrita por Da Silva *et al.* (2017), os frutos (30 g) foram pesados, selecionados, sanitizados, picados e submetidos à extração das enzimas utilizando água deionizada a 5 °C na proporção de 1:1. A mistura foi macerada delicadamente por 5 min, seguindo-se de filtração em pano de algodão. O filtrado foi centrifugado (8 min; 5 °C; 6000 rpm) e o sobrenadante (contendo as enzimas) separado. As enzimas foram separadas por precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  até alcançar 50% (m/v) de saturação. Para isso, o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (previamente moído) foi adicionado ao extrato em tubo tipo Falcon de 50 mL, seguindo-se agitação manual vagarosa por 9 min, *overnight* (12 h; 5 °C) e centrifugação (8 min; 5 °C; 6000 rpm). O precipitado obtido foi diluído com 6 mL de água deionizada a 5 °C e congelado até as análises. Essa mistura foi denominada extrato enzimático de macambira (EEM).

Todos os experimentos foram avaliados em triplicata e um controle negativo (branco), sendo assim, os extratos foram avaliados quanto à atividade enzimática, variando-se o pH (tampão fosfato a 5, 6, 7, 8 e 9) e a temperatura de incubação (30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C).

O ensaio de atividade enzimática foi realizado com base no método descrito por Daroit (2011). Uma mistura de reação contendo tampão fosfato (175 µL), azocaseína a 0,5% em água deionizada (300 µL) e EEM (25 µL) foi incubada por 15 min a 40 °C (ensaio variando o pH) e nas temperaturas indicadas no estudo de temperatura. Após incubação, a mistura de reação foi adicionada de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (m/v) em água deionizada, seguindo-se agitação em vórtex e centrifugação (10000 g; 5 °C; 5 min). O sobrenadante (800 µL) foi misturado com NaOH 1,8 M, sendo realizada a leitura desta mistura em espectrofotômetro (420 nm) usando cubeta de plástico (Figura 5). A atividade proteolítica foi determinada como a Abs/mL de extrato.

Figura 5 – Fluxograma metodológico do processo de extração e caracterização das enzimas (atividade enzimática e parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$ ) presentes na macambira.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2025.

#### 4.2.1 Determinação de parâmetros ótimos para a extração de proteases dos frutos de macambira

O processo de extração foi avaliado, variando-se diferentes razões entre a massa do fruto e o volume de solvente de extração (água deionizada): 1:1; 1:2,40; e 1:3,80 (m/v). O experimento foi realizado em três repetições, totalizando nove amostras experimentais. Os demais parâmetros de extração (exceto a razão fruto:solvente) e a atividade enzimática foram determinados como descrito anteriormente. O efeito da quantidade de solvente foi avaliado a partir da determinação da Atividade enzimática (U), Rendimento (U/Kg de fruto) e Pureza (%). As diferenças estatísticas entre os tratamentos foram analisadas por ANOVA, seguida do teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ) usando o Minitab® Statistical Software versão 22.

#### 4.3 Avaliação do poder coagulante do extrato enzimático no leite

Os frutos foram classificados em 5 tonalidades, conforme o grau de maturação (Figura 6-A), pesados, sanitizados e submetidos à extração com água mineral na proporção de 1:1 (esta proporção selecionada com base nos resultados dos estudos *in vitro*, descritos anteriormente). A mistura foi macerada delicadamente, seguindo-se de filtração em pano de poliéster. O filtrado, denominado extrato enzimático bruto de macambira (EEBM-1 a EEBM-5, sendo 1 a 5 se referindo às diferentes tonalidades), foi acondicionado (-20 °C/67%) em tubos de ensaio até serem avaliados em relação à atividade proteolítica *in situ* (Figura 6-B).

Figura 6 – A) Tonalidades coletadas do fruto da macambira; B) Processo metodológico para obtenção do EEBM.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2025.

Na avaliação da atividade proteolítica *in situ* (Figura 7;  $n = 3$ ), foi utilizado leite pasteurizado (65 °C/30 min) com a temperatura ajustada em 35 °C. Em volumes de

100 mL de leite, foram adicionados 2,5 mL de EEBM; controle positivo foi utilizado para comparação (coagulante comercial na dosagem recomendada pelo fabricante); após agitação por 10 s, a mistura foi incubada em banho-maria (modelo Centauro) a 35 °C e a ação coagulante (ponto de coagulação) monitorada visualmente em intervalos regulares de 3 min, até completar o tempo total de visualização (60 min). O leite bovino utilizado na pesquisa foi obtido no Laboratório de Bovinocultura do Campus Satuba, e o beneficiamento foi realizado no Laboratório de Análise Sensorial da mesma instituição. Já os coagulantes industriais utilizados nesta pesquisa (HA-LA® e COALA®, ambos de origem microbiana) foram adquiridos no comércio de Maceió-AL, e identificados como COMERCIAL-1 e COMERCIAL-2, respectivamente. Antes da adição do EEBM, o pH (pHmetro modelo LUCA 2010) do leite foi avaliado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 7 – Avaliação da atividade proteolítica *in situ*.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2025.

A partir dos resultados obtidos (tempo de coagulação), foi realizado o cálculo da atividade de coagulação do leite (MCA), conforme descrito por Anusha *et al.* (2024), usando a equação:

$$MCA \left( \frac{U}{mL} \right) = \frac{2400}{T} \times \frac{S}{E}$$

Dados: T = tempo de coagulação (em segundos); S = volume de leite (mL); E = volume de extrato (mL).

#### 4.4 Estabilidade da atividade enzimática do extrato enzimático durante o tempo de armazenamento

A influência do tempo de armazenamento (0, 10, 20, 30, 40 e 50 dias; -20,5 °C; n = 3) na atividade proteolítica do EEBM foi avaliada, com o objetivo de verificar a estabilidade do seu poder de coagulação do leite. O filtrado obtido conforme na seção 4.3 foi acondicionado em tubos de ensaio contendo 10 mL (Figura 8) e armazenado nestas condições. A avaliação da atividade proteolítica *in situ* foi realizada com base na seção 4.3, usando leite bovino pasteurizado (100 mL a 35 °C) como substrato.

Figura 8 – EEBM para verificação da ação coagulante no período de 50 dias.



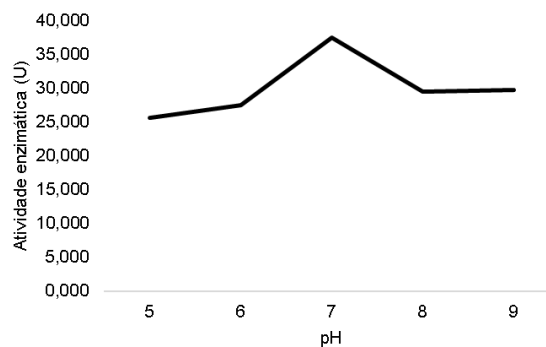
Fonte: Elaborado pelos autores, 2025.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização *in vitro* da atividade enzimática do extrato enzimático

Os resultados da caracterização *in vitro* estão descritos nas Figura 9 a 11. Referente à influência do pH (Figura 9), observou-se um aumento progressivo da atividade a partir do pH 6,0, atingindo seu ponto ótimo em pH 7,0, seguido de um abaixamento após este ponto (pH > 7,0). Este perfil é tecnologicamente promissor, visto que assemelha-se com a faixa de pH natural do leite bovino *in natura* (6,6 – 6,8).

Figura 9 – Efeito do pH sobre a atividade proteolítica.



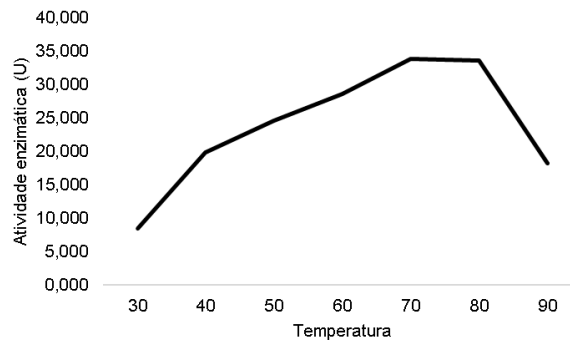
Fonte: Elaborado pelos autores, 2026.

O pH é um dos parâmetros críticos que determinam a ação das proteases durante o processo de coagulação. Esse parâmetro permite que, sob ação enzimática, ocorra a formação gradual e ordenada do coágulo. Além disso, essa característica reduz significativamente a necessidade de utilizar microrganismos ou acidificantes (orgânicos) no processo inicial de coagulação promovendo a redução do pH (Fox *et al.*, 2017). Bruno *et al.* (2010) indicaram que a utilização do extrato bruto do fruto verde de *Bromelia hieronymi* Mez no leite, em condições de pH 6,5, promoveu a formação de uma coalhada firme. Ressalta-se que ambas as espécies pertencem à mesma família (*Bromeliaceae*), o que sugere perfis enzimáticos semelhantes e boa aptidão na elaboração de queijos.

Com relação ao efeito da temperatura, a faixa ótima de atividade enzimática situou-se entre 70 °C a 80 °C, com destaque para o pico em 70 °C (Figura 10). Em temperaturas superiores a 80 °C, o decaimento da atividade pode ser decorrente do processo de desnaturação enzimática (Dala-Paula *et al.*, 2021). Vale ressaltar que,

embora o ponto ótimo seja elevado (70 °C), a atividade observada entre 35 °C a 40 °C é industrialmente viável, uma vez que se alinha à temperatura de 37 °C, usualmente aplicada na produção de queijos coagulados pela enzima quimosina (De Jesus, 2023).

Figura 10 – Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2026.

Em contraste com os resultados obtidos neste trabalho, Silva *et al.* (2022) realizaram um estudo correlato utilizando folhas da macambira (*Bromelia laciniosa* Mart. ex Schult.) sobre o substrato azocaseína. Os autores apontaram uma atividade ótima a 47 °C, inferior à encontrada nos frutos (70 °C). Outra observação foi o início do processo de desnaturação a 57 °C, revelando um perfil mais termolábil que o dos frutos, permanecendo estável até 80 °C.

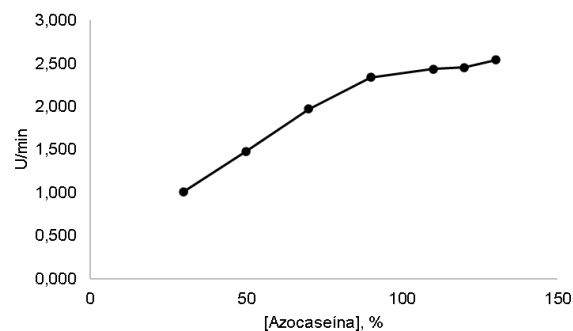
A elevada estabilidade térmica do EEM, observada entre 70 °C a 80 °C, pode estar associada à adaptação fisiológica da espécie ao seu habitat natural. Visto que a macambira (*Bromelia laciniosa* Mart. ex Schult.) apresenta características xerófitas, típicas de plantas adaptadas a diversas condições, inclusive às altas temperaturas (Duque, 2004; De Souza *et al.*, 2021). Tal condição possivelmente contribuiu com a alta estabilidade verificada. Adicionalmente, Santos (2023) indica que extratos vegetais, que possuem ação coagulante, apresentam elevado potencial tecnológico, em razão da alta termoestabilidade e elevado pH.

O perfil de resistência não é um evento isolado, mas sim uma característica notada na família *Bromeliaceae*. Essa tendência é corroborada por Vallés *et al.* (2007), ao utilizar os frutos da *Bromelia antiacantha* Bertol., e Silva Neto *et al.* (2023) com o uso das folhas de *Neoglaziovia variegata*, nas quais apresentaram atividade ótima

entre 60 °C a 65 °C. Observa-se que o EEBM se comporta de maneira similar, no entanto, superior aos resultados obtidos pelos autores.

Com o uso do substrato azocaseína, foi possível realizar a determinação dos parâmetros cinéticos  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) e  $V_{max}$  (velocidade máxima). A curva apresentada (Figura 11), demonstra um comportamento típico de enzimas Michaelianas (resultando em uma curva em formato de hipérbole). Verificou-se que a atividade enzimática aumentou linearmente com o acréscimo de substrato, até atingir uma faixa de saturação entre 0,090 a 0,110 g/100 mL. Após esse intervalo, nota-se uma tendência à estabilização da velocidade de reação (U/min), indicando a saturação dos sítios ativos das enzimas presentes no EEM.

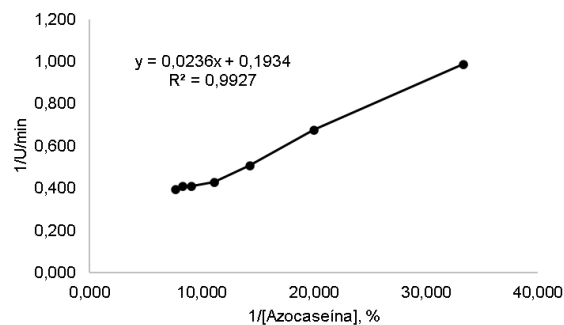
Figura 11 – Atividade enzimática em relação ao substrato azocaseína.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2026.

No que se refere ao cálculo das constantes cinéticas, os valores de concentração e velocidade foram ajustados ao gráfico de duplos recíprocos (Lineweaver-Burk) (Figura 12).

Figura 12 – Gráfico de Lineweaver-Burk.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2026.

Após o tratamento dos dados, determinou-se o valor de  $K_m$  (0,122 g/100 mL), indicando a concentração de substrato necessária a fim de que as enzimas constituintes atingissem 50% do seu  $V_{max}$ , estimada em 5,17 U/min. Segundo Chalabi *et al.* (2014), valores mais baixos de  $K_m$  refletem uma maior afinidade da protease pelo substrato específico. Devido à incipiência de dados na literatura, em relação aos parâmetros cinéticos do fruto da macambira (*Bromelia laciniosa* Mart. ex Schult.) ou estudos com condições experimentais similares (pH, temperatura, substrato), impossibilitou a comparação direta dos valores de  $K_m$  e  $V_{max}$ .

## 5.2 Determinação de parâmetros ótimos para a extração de proteases de frutos de macambira

O ensaio experimental para otimização da extração das enzimas da macambira foi conduzido utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR), variando-se os parâmetros de saturação do extrato e a razão fruto/água (solvente) durante a extração. Dentre os ensaios realizados, a proporção 1:1 não houve diferença significativa em relação à atividade enzimática (U), rendimento (U/kg de fruto) e à pureza (%), sendo, portanto, considerada a melhor em comparação às demais proporções testadas, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Influência da razão solvente/fruto na atividade enzimática, rendimento e pureza dos extratos (n = 3).

Atributos	razão solvente/fruto		
	1:1	2,4:1	3,8:1
Atividade enzimática (U)	34,57 ± 0,37 <sup>a</sup>	14,01 ± 0,46 <sup>b</sup>	9,21 ± 0,03 <sup>c</sup>
Rendimento (U/Kg de fruto)	1152,44 ± 12,18 <sup>a</sup>	280,27 ± 9,11 <sup>c</sup>	921,33 ± 2,67 <sup>b</sup>
Pureza (%)	403,23 ± 4,26 <sup>a</sup>	288,81 ± 9,39 <sup>b</sup>	178,21 ± 0,52 <sup>c</sup>

\*Os valores são expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas entre as razões solvente/fruto ( $p < 0,05$ ), conforme determinado pelo teste de Tukey. Fonte: Elaborado pelos autores, 2025.

## 5.3 Avaliação do poder coagulante do extrato enzimático no leite

Os resultados da avaliação do poder coagulante do extrato enzimático no leite estão descritos na Tabela 2. Apenas o extrato EEBM-3 apresentou atividade

coagulante durante o período avaliado, registrando uma MCA de 533 U/mL. Contudo, ao ser comparado aos coagulantes comerciais (COMERCIAL-1 e COMERCIAL-2), o EEBM-3 mostrou-se menos ativo. Ambos apresentaram poder coagulante de 1:3.000 / 75 IMCU e, diluídos conforme recomendação do fabricante (8 mL para 10 L de leite), promoveram a coagulação em 15 min e 9 min, respectivamente.

Tabela 2 – Verificação da ação coagulante das diferentes tonalidades do fruto da macambira com leite pasteurizado (n = 3).

Tratamentos	Qnt. Leite (mL)	Coagulante (mL)	Coagulação (min)	MCA (U/mL)
EEBM-3	100	2,5	3	533
COMERCIAL-1	100	0,08	15	3333
COMERCIAL-2	100	0,08	9	5555

Dados: EEBM-3 = extrato enzimático bruto de macambira, tonalidade 3; COMERCIAL-1 = água, cloreto de sódio, quimosina, polietilenoglicol, conservador benzoato de sódio (INS 211), regulador de acidez fosfato monossódico (INS 339 (i)); COMERCIAL – 2 = água, cloreto de sódio, protease obtida por fermentação (*Rhizomucor miehei*), conservador benzoato de sódio (INS 211); os demais extratos, EEBM-1 (extrato enzimático bruto de macambira, tonalidade 1), EEBM-2 (extrato enzimático bruto de macambira, tonalidade 2), EEBM-4 (extrato enzimático bruto de macambira, tonalidade 4) e EEBM-5 (extrato enzimático bruto de macambira, tonalidade 5), não apresentaram atividade coagulante; Fonte: Elaborado pelos autores, 2025.

Apesar do MCA menor em relação ao observado nos coagulantes industriais, o valor obtido para o EEBM-3 (533 U/mL) demonstra similaridade com dados presentes na literatura (Nicosia *et al.*, 2022). Importante destacar que o extrato avaliado não foi purificado, diferentemente das enzimas industriais utilizadas para comparação. Tal condição impacta na eficiência da enzima, visto que em sua forma purificada maximiza o seu papel catalítico (Haas; Kempka, 2019). Estudos conduzidos por Nicosia *et al.* (2022) destacaram a atividade coagulante/MCA para *Morinda citrifolia* (popularmente conhecida como Noni) e *Calotropis gigantea* (conhecida como Madar), sendo 238,8 U/mL e 450 U/mL, respectivamente, evidenciando o potencial do EEBM como alternativa vegetal viável.

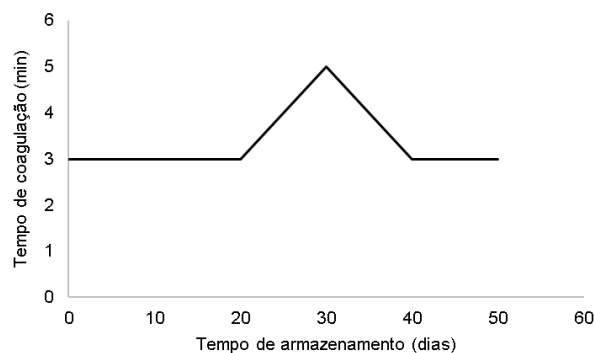
#### 5.4 Estabilidade da atividade enzimática do extrato enzimático durante o tempo de armazenamento

Estudos de estabilidade proteolítica em diferentes condições são importantes para compreender como determinadas variáveis influenciam a atividade coagulante de extratos enzimáticos. Mediante aos resultados anteriores, o EEBM-3 foi utilizado neste estudo; o tempo de armazenamento é uma variável determinante, considerando a necessidade de conservar os extratos durante o período de entressafra, uma vez que os frutos estão disponíveis apenas em duas épocas do ano (março e setembro) (De Souza *et al.*, 2021). Além disso, estudos sobre a influência do tempo de armazenamento são essenciais para determinar o tempo de vida útil dos extratos em futuras condições de disponibilidade nas prateleiras do mercado.

De acordo com Carneiro (2003), boa parte das enzimas pode ser armazenada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  com uso de estabilizadores (por exemplo, cloreto de cálcio). Heller *et al.* (1997) acrescentam que, embora o congelamento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  seja o meio de conservação mais utilizado, tais temperaturas podem impactar na atividade enzimática. Conjuntamente, as alterações do pH e mudanças estruturais das enzimas, causadas pela formação de cristais de gelo, resultam em sua baixa estabilidade.

Com o resultado expresso na Figura 13, a atividade proteolítica manteve-se, de um modo geral, constante ao longo do período avaliado (50 dias). No ponto 3 (30 dias), observando-se um aumento no tempo de coagulação, possivelmente associado a variações de temperatura experimental; a partir do ponto 4 (40 dias) estabilizou novamente para 3 min, indicando que os extratos podem ser armazenados durante esse intervalo (dias) sem perda da atividade coagulante, o que assegura a disponibilidade do EEBM-3 em futuras aplicações na fabricação de queijos.

Figura 13 – Verificação da ação coagulante do EEBM sob congelamento durante o período de 50 dias.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2025.

## 6 CONCLUSÕES

O extrato enzimático de macambira apresentou elevado potencial como alternativa sustentável de coagulante de origem vegetal. Os ensaios *in vitro* ( $K_m$  de 0,122 g/100 mL e  $V_{max}$  de 5,17 U/min) e *in situ*, com atividade coagulante (MCA) de 533 U/mL para o EEBM da tonalidade 3. Ao ser comparado com os coagulantes industriais, o EEBM apresentou menor atividade; no entanto, vale ressaltar que o extrato não passou pelo processo de purificação. Com relação à estabilidade durante o armazenamento, verificou-se que o EEBM pode ser armazenado durante 50 dias, sem perdas na atividade enzimática.

Este estudo poderá contribuir futuramente para o fortalecimento da bioeconomia local e na valorização do bioma Caatinga, ao empregar a macambira (*Bromelia laciniosa* Mart. ex Schult.), espécie endêmica desse ecossistema, como recurso biotecnológico. Os resultados também suprem lacunas na literatura e mostra-se pioneiro ao investigar a aplicação enzimática do fruto da macambira no leite bovino, ressaltando seu potencial inovador.

A pesquisa apresenta potencial científico e aplicabilidade na elaboração de alimentos, com destaque para a produção de queijos. Estudos posteriores devem ser conduzidos a fim de avaliar a ação dos extratos na fabricação de queijos, principalmente em sua forma purificada, comparando-os com proteases convencionalmente utilizadas nesse processo.

## REFERÊNCIAS

ADALJA, A. *et al.* GMO and Non-GMO Labeling Effects: Evidence from a Quasi-Natural Experiment. **Marketing Science**, v. 42, n. 2, p. 233–250, mar. 2023.

ADETUNJI, V. O.; SALAWU, O. T. West African soft cheese ‘wara’ processed with *Calotropis procera* and *Carica papaya*: A comparative assessment of nutritional values. **African journal of Biotechnology**, v. 7, n. 18, 2008.

AKÇAY, U. Ç.; ÇAYIR, Ö. S. Ş, Bedia. Investigation of miniature goat cheese produced from *Cynara scolymus* L. pistil cell suspension culture extracts elicited with melatonin and salicylic acid. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 105, n. 1, p. 353-361, 2025.

ALMEIDA, C. M.; SIMÕES, I. Cardoon-based rennets for cheese production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 4675-4686, 2018.

ALVARENGA, J. *et al.* A importância da gestão da cadeia de suprimentos na estratégia de sustentabilidade na indústria alimentícia. In: ENCONTRO DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO PROFISSIONAIS EM ADMINISTRAÇÃO, 9., 2023, São Paulo. **Anais** [...]. São Paulo: FEAUSP, 2023. Disponível em: [https://www.mackenzie.br/fileadmin/ARQUIVOS/Public/6-pos-graduacao/upm-higienopolis/mestrado-doutorado/admin-desen-negocios/2024/2\\_A\\_IMPORT%C3%82NCIA\\_DA\\_GEST%C3%83O\\_DA\\_CADEIA\\_D E\\_SUPRIMENTOS\\_NA\\_ESTRAT%C3%89GIA.pdf](https://www.mackenzie.br/fileadmin/ARQUIVOS/Public/6-pos-graduacao/upm-higienopolis/mestrado-doutorado/admin-desen-negocios/2024/2_A_IMPORT%C3%82NCIA_DA_GEST%C3%83O_DA_CADEIA_D E_SUPRIMENTOS_NA_ESTRAT%C3%89GIA.pdf). Acesso em: 14 jan. 2026.

ANUSHA, R. *et al.* Characterisation of potential milk coagulants from *Calotropis gigantea* plant parts and their hydrolytic pattern of bovine casein. **European Food Research and Technology**, v. 238, n. 6, p. 997–1006, 2014. [a-versatilidade-da-caseina-228894/](#).

BEN AMIRA, 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**, v. 20, n. sup1, p. S76-S93, 2017.

BENZING, D. H. **Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation**. University Press: Cambridge, 2000, 290 p.

BRASIL. Decreto-lei nº 923, de 10 de outubro de 1969. Dispõe sobre a comercialização do leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, 13 out. 1969.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018**. Aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ed. 230, p. 9, 30 nov. 2018.

BRUNO, M. A. *et al.* Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. **LWT - Food Science and Technology**. v. 43, p. 695–701, 2010.

CARNEIRO, A. F. G. C. **Estabilização de enzimas para modificação de fibras sintéticas**. 2003. Dissertação (Mestrado em Tecnologias de Fabricação) – Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Guimarães, 2003.

CHALABI, M. *et al.* Proteolytic activities of kiwifruit actinidin (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) on different fibrous and globular proteins: a comparative study of actinidin with papain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 8, p. 4025-4037, 2014.

CONTI, L. H. A.; SANTOS, M. V. **Fatores que afetam a estabilidade térmica do leite ao teste do álcool – Parte 1**. *MilkPoint*, 19 out. 2009. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/marco-veiga-dos-santos/>. Acesso em: 16 jan. 2026.

DA SILVA, J. D. F. *et al.* Buffalo cheese whey hydrolyzed with Alcalase as an antibrowning agent in minimally processed apple. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, p. 3731-3738, 2018.

DALA-PAULA, B. M. *et al.* **Química & bioquímica de alimentos**. 1. ed. Alfenas, MG: Universidade Federal de Alfenas, 2021. *E-book*. Disponível em: <https://educapes.capes.gov.br/bitstream/capes/598853/2/Quimica%20%26%20Bioquimica%20de%20Alimentos.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2026.

DAROIT, D. J. **Potencial Queranolítico E Caracterização De Uma Queratinase Extracelular De Bacillus Sp**. P45. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - UFRGS, Porto Alegre, 2011.

DE JESUS, J. C. **Caracterização de coagulante vegetal obtido da flor da alcachofra (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* L.) e sua influência na produção e maturação do queijo**. 2023. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2023.

DE SOUZA, E. H. *et al.* Macambiras, the most northeastern of the xerophiles: taxonomy, distribution and potential: Macambiras, as mais nordestinas das xerófilas: taxonomia, distribuição e potencialidades. **Revista Macambira**, v. 5, n. 1, p. e051005-e051005, 2021.

DO VALE, R. T. R. *et al.* **A versatilidade da caseína**. *MilkPoint*, THERMA, 2022. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/thermaufv/>. Acesso em: 14 jan. 2026.

DRUGOVA, T. *et al.* Are multiple labels on food products beneficial or simply ignored? **Canadian Journal of Agricultural Economics/Revue canadienne d'agroéconomie**, v. 68, n. 4, p. 411–427, dez. 2020.

DUQUE, J. G. **O Nordeste e as lavouras xerófilas**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2004, 330 p.

DUTRA, A. S. *et al.* Germinação de sementes de macambira (*Bromelia laciniosa* Mart. ex Schult). **Revista Caatinga**, v. 23, n. 2, p. 12-17, 2010.

EGITO, A. S. *et al.* Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein. **International Dairy Journal**, v.17, p.816-825, 2007.

FARIAS, V. A. **Peptidases cisteínicas do fruto de noni (*Morinda citrifolia* L.) como agentes coagulantes de leite**. 2016. 103 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

FOX, P. F. *et al.* **Fundamentals of Cheese Science**. 2nd ed. 2017 ed. Boston, MA: Springer, 2017.

FREITAS, T. D. *et al.* **Proteínas lácteas: grandes veículos para compostos bioativos**. *MilkPoint*, 30 mar. 2021. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/thermaufv/proteinas-lacteas-grandes-veiculos-para-compostos-bioativo-224746/>. Acesso em: 15 jan. 2026.

FURTADO, M. **Queijos Semi Duros**. São Paulo: setembro Editora, 2019.

GARCIA, G. O. M. *et al.* **Tecnologia de queijos: coagulação ácida versus enzimática**. *MilkPoint*, 30 out. 2024. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/artigos/industria-de-laticinios/tecnologia-de-queijos-coagulacao-acida-versus-enzimatica-237656/>. Acesso em: 9 jan. 2026.

GOUDA *et al.*, cont. atualizado. **Uma lista de nomes aceitos de Bromeliaceae**. Jardim Botânico Universitário, Utrecht. Disponível em: <http://bromeliad.nl/>.

GOUVÊA, M. S. **Utilização da enzima papaína como coagulante na fabricação de queijo minas frescal**. 2018. Projeto Final de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Campus Inconfidentes, Inconfidentes, MG, 2018. Disponível em: [https://portal.ifs.ifsuldeminas.edu.br/arquivos/paginas/menu\\_institucional/departamentos/Biblioteca/tcc/Mariana\\_Soares\\_Gouv%C3%AAa.pdf](https://portal.ifs.ifsuldeminas.edu.br/arquivos/paginas/menu_institucional/departamentos/Biblioteca/tcc/Mariana_Soares_Gouv%C3%AAa.pdf). Acesso em: 11 jan. 2026.

HAAS, A. *et al.* **Extração e purificação de peroxidases vegetais: uma revisão**. Periódico Tché Química, Porto Alegre, v. 16, n. 31, p. 692-703, 2019.

HALICKA, E. *et al.* Investigating the Consumer Choices of Gen Z: A Sustainable Food System Perspective. **Nutrients**, v. 17, n. 3, p. 591, 6 fev. 2025.

HELLER, M. C. *et al.* Manipulation of lyophilization-induced phase separation: Implications for pharmaceutical proteins. **Biotechnology progress**, v. 13, n. 5, p. 590-596, 1997.

INÁCIO, R. S. *et al.* Evolution of Qualitative and Quantitative Lipid Profiles of High-Pressure-Processed Serra da Estrela Cheese throughout Storage. **Applied Sciences**, v. 13, n. 10, p. 5927, 2023.

LEITE JÚNIOR, B. R. C.; VIEIRA, E. N. R. **Coalho e coagulantes: qual o ideal para produção de queijos?** *MilkPoint*, 12 ago. 2021. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/lipaufv/coalho-e-coagulantes-qual-o-ideal-para-producao-de-queijos-226769/>. Acesso em: 18 dez. 2025.

LEME, E. M. C. **Canistrum**: bromélias da Mata Atlântica. Rio de Janeiro: Salamandra, 1997.

LEME, E. M. C.; MARIGO, L. C. **Bromélias na natureza**. Rio de Janeiro: Marigo Comunicações Visuais, 1993. 183 p.

LIMA GUIMARÃES, O. C. *et al.* Goat Cheese Produced with Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seed Extract and a Native Culture of *Limosilactobacillus mucosae*: Characterization and Probiotic Survival. **Foods**, v. 13, n. 18, p. 2905, 2024.

LIMA-SARAIVA, R. G. **Efeito antinociceptivo de espécies de Bromeliaceae nativas da Caatinga: um estudo comparativo**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

LITRENTA, F. *et al.* The Identification of Potential Nutritional and Sensory Markers for the Authentication of an Innovative Canestrato Cheese Based on Plant-Derived Rennet. **Dairy**, v. 5, n. 4, p. 828-841, 2024.

LIU, X. *et al.* Advances in research on calf rennet substitutes and their effects on cheese quality. **Food Research International**, v. 149, p. 110704, nov. 2021.

LUTHER, H. E. **An alphabetical list of bromeliad binomials**. 10. ed. Sarasota: The Bromeliad Society International, 2006.

MANUELIAN, C. L. *et al.* Effects of animal versus vegetal rennet on milk coagulation traits in Mediterranean buffalo bulk milk. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 6, p. 4958–4964, jun. 2020.

NASSU, R. T. *et al.* **Queijo de coalho**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. (Coleção Agroindústria Familiar). 40 p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/117913/1/00077390.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2025.

THALER NETO, A. T. *et al.* **Qualidade do leite**. Curitiba: Senar-AR/PR, 2022. 125 p. Disponível em: [https://www.sistemafaep.org.br/wp-content/uploads/2025/04/PR.0353-Qualidade-do-Leite\\_web.pdf](https://www.sistemafaep.org.br/wp-content/uploads/2025/04/PR.0353-Qualidade-do-Leite_web.pdf). Acesso em: 15 dez. 2025.

SILVA NETO, G. J. *et al.* Caracterização parcial de Bromelina extraída das folhas de *Neoglaziovia Variegata* (Arruda) Mez e sua aplicação como coagulante de leite. In:

SOUSA, S. *et al.* CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE BROMELINA EXTRAÍDA DAS FOLHAS DE *NEOGLAZIOVIA VARIEGATA* (ARRUDA) MEZ E SUA APLICAÇÃO COMO COAGULANTE DE LEITE. **Anais do Encontro Nacional da Agroindústria (IX ENAG)**. UFPB: Even3, 2023. Disponível em: [https://www.even3.com.br/ebook/ixenag/715722-CARACTERIZACAO-PARCIAL-DE-BROMELINA-EXTRAIDA-DAS-FOLHAS-DE-NEOGLAZIOVIA-VARIEGATA-\(ARRUDA\)-MEZ-E-SUA-APLICACAO-CO](https://www.even3.com.br/ebook/ixenag/715722-CARACTERIZACAO-PARCIAL-DE-BROMELINA-EXTRAIDA-DAS-FOLHAS-DE-NEOGLAZIOVIA-VARIEGATA-(ARRUDA)-MEZ-E-SUA-APLICACAO-CO). Acesso em: 17 jan. 2026.

NICOSIA, F. D. *et al.* Plant milk-clotting enzymes for cheesemaking. **Foods**, v. 11, n. 6, p. 871, 2022.

OLIVEIRA, D. P. **Avaliação físico-química e microbiológica de leite in natura de origem búbalina produzido na região do Baixo Amazonas**. 2022. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2022.

PACIFICO, S. *et al.* Exploring New Fruit-and Vegetable-Derived Rennet for Cheese Making. **Applied Sciences**, v. 14, n. 6, p. 2257, 2024.

PANETTO, J. C. C. *et al.* **Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro: sumário brasileiro de touros: 7ª avaliação genômica de touros: resultado do teste de progênie**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2024. 115 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 283). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1163946>. Acesso em: 20 jan. 2026.

PESCHEL, A. O. *et al.* Personality traits and preferences for production method labeling – A latent class approach. **Food Quality and Preference**, v. 74, p. 163–171, jun. 2019.

RODRIGUES, R. C.; LAGUNA, L. E. Identificação de enzimas vegetais com atividade coagulante sobre o leite para possível utilização na fabricação de queijos de cabra. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UVA, 2., 2000, Sobral. **Anais [...]**. Sobral: Universidade Estadual Vale do Acaraú, 2001. p. 20. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/531663/1/RACIdentificacaodeenzimas.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2026.

RAMON, P.O.R.; SILVA, D.A. **Bactérias de auxílio na maturação dos queijos (NSLAB) e seus benefícios para a saúde**. *Milkpoint*. 2019. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/adriano-gomes-da-cruz/bacterias-de-auxilio-na-maturacao-dos-queijos-nslab-e-seus-beneficios-para-a-saude-206803/>. Acesso em: 15 jan. 2026.

RAMPANTI, G. *et al.* Queijo Serra da Estrela PDO Cheese: Investigation into Its Morpho-Textural Traits, Microbiota, and Volatilome. **Foods**, v. 12, n. 1, p. 169, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/1/169>.

RICHARDS, N. S. P. S. (ed.). **Produtos lácteos: desenvolvimento & tecnologia**. Canoas: Mérida Publishers, 2020. *E-book* (PDF). <https://doi.org/10.4322/mp.978-65-991393-2-1>. Acesso em: jan. 2026.

RINCÓN, A. A. et al. Influence of vegetable coagulant and ripening time on the lipolytic and sensory profile of cheeses made with raw goat milk from Canary breeds. **Food Science and Technology International**, v. 23, n. 3, p. 254-264, 2017.

ROCHA, R. et al. Microbiological Characterization of Protected Designation of Origin Serra da Estrela Cheese. **Foods**, v. 12, n. 10, p. 2008, 2023.

SANTOS, M. A. **Avaliação da atividade coagulante do extrato de sementes de chia (*Salvia hispanica* L.) no leite bovino**. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Maceió, 2023.

SILVA, D. et al. Bioactivity of hydrolysates obtained from buffalo caseinate using macambira (*Bromelia laciniosa* L.) proteases. **Concilium**, [S. l.], v. 24, n. 14, p. 420-439, 15 jul. 2024.

SILVA, D. et al. Biochemical Characteristics and Healing Activity of *Bromelia laciniosa* Leaf Protease. **Catalysis Research**, v. 2, n. 3, p. 1-34, 2022.

SILVA, G. et al. **Derivados do leite**. Curitiba: Instituto Federal do Paraná, 2012. Disponível em: [https://ifpr.edu.br/pronatec/wpcontent/uploads/sites/46/2012/07/Derivados\\_do\\_Leite.pdf](https://ifpr.edu.br/pronatec/wpcontent/uploads/sites/46/2012/07/Derivados_do_Leite.pdf). Acesso em: 16 dez. 2025.

SILVA, N. N. et al. Micelas de caseína: dos monômeros à estrutura supramolecular. **Revista Brasileira de Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. e2018185, 2019.

SIQUEIRA, K. B. (ORG.). **Na era do consumidor: Uma visão do mercado lácteo brasileiro**. Juiz de Fora, MG: Kennya Siqueira, 2021. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1134890>. Acesso em: 15 dez. 2025.

SIQUEIRA, K. B. **Mercado consumidor**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2019. (Comunicado Técnico, 120). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1110792/1/CT120MercadoConsumidorKennya.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2025.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. **Pitcairnioideae (Bromeliaceae)**. Flora Neotropica Monographs, v. 14, n. 1, 1974.

SOUSA, G. A. **Processo de coagulação do leite por diferentes agentes coagulantes comerciais e sua influência sobre a composição do soro**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Industrial) – Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2022. Disponível em: <https://repositorio.unifesp.br/server/>

api/core/bitstreams/8f3f80e0-9277-41cf-85ae-b230d11e018b/content. Acesso em: 10 jan. 2026.

SOUZA, L. B. *et al.* **Por que o leite coagula?** *MilkPoint*, 7 dez. 2023. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/thermaufv/por-que-o-leite-coagula-235708/>. Acesso em: 9 jan. 2026.

SOUZA, T. O. *et al.* Utilização de resíduos agroindustriais como substratos para produção de proteases coagulantes do leite por *Trichoderma spp.* Isolado do cerrado piauiense. **International Journal of Agrarian Sciences-PDVAGRO**, v. 4, n. 2, p. 36-53, 2024.

TARAPATA, J. *et al.* Physicochemical properties of skim milk gels obtained by combined bacterial fermentation and renneting: Effect of incubation temperature at constant inoculum level. **International Dairy Journal**, v. 123, p. 105167, 1 dez. 2021.

TESFAW, A. T. *et al.* Exploring cheese production enzymes from various plants as an alternative to Calf rennet. **Discover Food**, v. 4, n. 1, p. 141, 2024.

VALLÉS, D. *et al.* Characterization of news proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 3, p. 409-413, 2007.

VIDAL, A. M. C.; SARAN NETTO, A. **Obtenção e processamento do leite e derivados**. Universidade de São Paulo. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2018. DOI: <https://doi.org/10.11606/9788566404173>. Disponível em: [www.livrosabertos.abcd.usp.br/portaldelivrosUSP/catalog/book/200](http://www.livrosabertos.abcd.usp.br/portaldelivrosUSP/catalog/book/200). Acesso em: 10 dez. 2025.

YASMIN, A. *et al.* *Withania coagulans*: a comprehensive exploration of its botanical, phytochemical, and pharmacological properties. **Medicinal Chemistry Research**, v. 34, n. 8, p. 1663-1687, 2025.