

Otimização da produção de extrato de kiwi: avaliação das condições ideais de pH e temperatura para aplicação como coagulante vegetal

Adelaine Camargos Batista^[1], Lucas Henrique Ramos de Oliveira^[2], Brenda Ketilyn Lages de Paula^[3], Hugo José Martins Carvalho^[4], Vivian Machado Benassi^[5], Larissa de Oliveira Ferreira Rocha^{[6]*}

^[1] adelaine.camargos@ufvjm.edu.br, ^[2] lucas.henrique@ufvjm.edu.br, ^[3] brenda.ketilyn@ufvjm.edu.br, ^[4] martins.hugo@ufvjm.edu.br, ^[5] vivian.benassi@ict.ufvjm.edu.br, ^[6] larissa.rocha@ict.ufvjm.edu.br. Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Diamantina, Minas Gerais, Brasil

* Autora correspondente

Resumo

Extratos vegetais ganharam destaque devido às suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e proteolíticas, oferecendo alternativas sustentáveis ao coalho de origem animal. A actinidina (EC 3.4.22.14) é uma protease encontrada no kiwi (*Actinidia deliciosa*) que auxilia na coagulação do leite em condições tipicamente utilizadas na fabricação de queijos. Pesquisas mostram que a atividade proteolítica do kiwi é semelhante à de outras frutas comumente utilizadas na produção comercial de proteases, como abacaxi, mamão e figo, devido à sua alta atividade enzimática. Este estudo teve como objetivo produzir e otimizar extrato bruto de kiwi, sem etapas de purificação, para uso como coagulante vegetal na indústria de laticínios. A atividade proteolítica do extrato de kiwi foi avaliada utilizando duas soluções tampão (fosfato e citrato) por meio da metodologia de superfície de resposta. Os resultados mostraram que o extrato preparado em tampão fosfato apresentou maior atividade proteolítica (0,734 U.mL⁻¹) em comparação ao tampão citrato (0,455 U.mL⁻¹). Além disso, as condições ótimas de atividade enzimática foram observadas a 55-60 °C e pH 5,8-6,2 para o tampão fosfato, e a 55-60 °C e pH 5,8-7,0 para o tampão citrato. A validação dos resultados mostrou baixo desvio relativo, indicando alta confiabilidade dos dados. O tampão fosfato também apresentou maior atividade proteolítica e um R² > 0,70, destacando o potencial do extrato de kiwi como um coagulante vegetal sustentável para a produção de queijo. As condições ideais para a obtenção do extrato de kiwi foram identificadas com tampão fosfato a 57,5 °C e pH 5,75. Este estudo enfatiza a importância de explorar novas fontes vegetais e otimizar as condições de extração para a tecnologia de alimentos, promovendo a sustentabilidade e a inovação.

Palavras-chave: *Actinidia deliciosa*; actinidina; atividade proteolítica; coagulantes vegetais; extratos vegetais.

Optimization of kiwi extract production: evaluation of ideal pH and temperature conditions for application as a vegetable coagulant

Abstract

Plant extracts have gained prominence because of their antioxidant, antimicrobial, and proteolytic properties, offering sustainable alternatives to animal-based rennet. Actinidin (EC 3.4.22.14) is a protease found in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) that aids in milk coagulation under conditions typically used in cheesemaking. Research shows that kiwifruit's proteolytic activity is similar to that of other fruits commonly used in commercial protease production, such as pineapple, papaya, and fig, due to their high enzymatic activity. This study aimed to produce and optimize raw kiwifruit extract, without purification steps, for use as a plant-based coagulant in the dairy industry. The proteolytic activity of the kiwi extract was evaluated using two buffer solutions (phosphate and citrate) through response surface methodology. The results showed that the extract prepared in phosphate buffer exhibited higher proteolytic activity (0.734 U.mL⁻¹) compared to citrate buffer (0.455 U.mL⁻¹). Furthermore, the optimal enzymatic activity conditions were observed at 55-60 °C and pH 5.8-6.2 for the phosphate buffer, and at 55-60 °C and pH 5.8-7.0 for the citrate buffer. Validation of the results showed a low relative deviation, indicating high data reliability. The phosphate buffer also showed

higher proteolytic activity and an $R^2 > 0.70$, highlighting the potential of kiwi extract as a sustainable plant-based coagulant for cheese production. The optimal conditions for obtaining the kiwi extract were identified using phosphate buffer at 57.5 °C and pH 5.75. This study emphasizes the importance of exploring new plant sources and optimizing extraction conditions for food technology, promoting sustainability and innovation.

Keywords: *Actinidia deliciosa*; actinidina; plant coagulants; plant extracts; proteolytic activity.

1 Introdução

Os extratos vegetais vêm ganhando destaque em diversas indústrias devido à sua composição rica em compostos voláteis, aromáticos e bioativos (Samadi *et al.*, 2021). Esses compostos, além de conferirem propriedades sensoriais singulares, apresentam atividades antioxidantes e antimicrobianas intrínsecas, o que os torna elementos estratégicos para aplicações nas indústrias farmacêutica, alimentícia, cosmética, agrícola e de cuidados com a saúde (Acimović *et al.*, 2022). Tais propriedades funcionais têm impulsionado seu uso crescente como aditivos naturais na indústria de alimentos, sendo empregados para retardar a deterioração sensorial, preservar a coloração e prolongar a vida útil de produtos processados, especialmente carnes prontas para consumo (Nikmaram *et al.*, 2018).

Além dessas aplicações, os extratos vegetais têm sido explorados em sistemas de revestimento e conservação de alimentos, devido às suas características não tóxicas, biodegradáveis, de baixo custo, ampla disponibilidade e ausência de metais pesados. A matéria-prima vegetal utilizada na extração pode ser proveniente de diferentes partes da planta, como raízes, folhas, cascas, frutos e sementes (Ong; Kasi; Subramanian, 2021).

Apesar do potencial promissor, a obtenção eficiente dos extratos a partir de suas fontes naturais e a avaliação precisa de suas propriedades funcionais ainda representam desafios relevantes para a aplicação em escala industrial. A superação dessas limitações é fundamental para a ampliação do uso de extratos vegetais em formulações tecnológicas (Nikmaram *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, estudos têm enfatizado o potencial dos extratos vegetais no processamento de produtos lácteos, sobretudo por serem fontes de enzimas proteolíticas. Diversas espécies têm sido investigadas, como o látex de *Jacaratia corumbensis* (Arruda *et al.*, 2012), fruto do kiwi (*Actinidina L.*) (Mazorra-Manzano *et al.*, 2013), caules e folhas de funcho (*Foeniculum vulgare*) (Bey *et al.*, 2018), o fruto do noni (*Morinda citrifolia L.*) (Farias *et al.*, 2020), a batata (*Solanum tuberosum*) (Tito *et al.*, 2020) e a flor do cardo (*Cynara cardunculus*) (Alavi; Momen, 2020). As proteases são amplamente utilizadas na coagulação do leite, etapa crucial na fabricação de queijos, sendo o coalho animal, rico em quimosina, a enzima tradicionalmente empregada (Liu *et al.*, 2021). Contudo, a busca por alternativas vegetais tem se intensificado, motivada por aspectos éticos, religiosos, ambientais e nutricionais.

A utilização de coagulantes vegetais se mostra particularmente relevante para atender consumidores com restrições alimentares, como lactovegetarianos e ovolactovegetarianos, que evitam o consumo de produtos derivados de animais. Nesse cenário, enzimas vegetais como a actinidina, protease cisteína encontrada no kiwi (EC 3.4.22.14), emergem como alternativas sustentáveis, com potencial para agregar valor nutricional e sensorial aos produtos finais (Nicosia *et al.*, 2022a).

Além de atuar na coagulação, esses agentes vegetais influenciam diretamente a textura e a maturação do queijo, podendo acelerar processos enzimáticos e reduzir custos industriais (Esposito *et al.*, 2016; Rampanti *et al.*, 2023). A análise detalhada da degradação das frações de caseína e dos peptídeos gerados permite compreender melhor a ação específica dessas enzimas (Gonçalves *et al.*, 2016). A actinidina do kiwi tem como substrato preferencial a β -caseína, seguida da κ -caseína. A hidrólise dessas proteínas resulta na formação de um número reduzido de peptídeos de maior massa molecular, o que contribui para a minimização da formação de sabores indesejáveis em produtos lácteos. Em contrapartida, outras enzimas de origem vegetal tendem a gerar sabores amargos, em razão da atividade proteolítica excessiva, o que limita seu uso em aplicações industriais (Serra *et al.*, 2020; Nicosia *et al.*, 2022b).

Nesse sentido, o extrato de kiwi, devido à actinidina, tem se destacado, com propriedades que se alinham às condições ideais do processo de coagulação do leite, principalmente quanto ao pH e à

temperatura (Carne; Moore, 1987; Henriques, 2014). O kiwi é amplamente cultivado e reconhecido por seu elevado teor de vitamina C, fibras, antioxidantes e, sobretudo, pela actinidina, enzima com potencial para substituir o coalho animal em escala industrial (Puglisi; Petrone; Lo Piero, 2014). Estudos como o de Tamiozzo (2016) demonstraram a viabilidade do uso de coagulante à base de kiwi na fabricação de queijos, apresentando atividade proteolítica superior (21,23 U/mL) quando comparado a coagulantes obtidos de gengibre e limão. O extrato de kiwi demonstrou melhorar as propriedades nutracêuticas de queijos produzidos a partir de leite de ovelha e de búfala, promovendo um aumento na concentração de polifenóis e fitoesteróis em comparação aos queijos obtidos com coalho de vitela (Serra *et al.*, 2020). Nicosia *et al.* (2022b) evidenciaram que o extrato aquoso de kiwi constitui uma tecnologia limpa e viável como coagulante vegetal na fabricação de queijos. As proteases presentes no kiwi apresentaram propriedades semelhantes às da quimosina, destacando-se como a alternativa com maior potencial para aplicação como agente coagulante na produção de queijos, quando comparadas às proteases extraídas de abacaxi e gengibre (Fguiri *et al.*, 2025).

Diante desse panorama, o presente estudo teve como objetivo produzir o extrato de kiwi e determinar suas condições ideais de pH e temperatura, com vistas à obtenção de um extrato vegetal com elevada atividade proteolítica, capaz de atuar como um agente coagulante sustentável na indústria de laticínios.

Após a introdução, que contextualiza o uso de extratos vegetais com ênfase em sua aplicação como agentes coagulantes, as demais seções deste artigo estruturam-se da seguinte forma: na seção 2, descrevem-se os procedimentos adotados para a preparação e análise dos extratos de kiwi. Na seção 3, os dados obtidos são submetidos a análises estatísticas apropriadas, possibilitando a interpretação crítica dos resultados e a identificação das condições ideais de pH e temperatura para a maximização da atividade enzimática. Por fim, na seção 4, destaca-se o potencial do extrato de kiwi como coagulante de origem vegetal, bem como a relevância de futuras investigações voltadas à sua viabilização e aplicação em escala industrial.

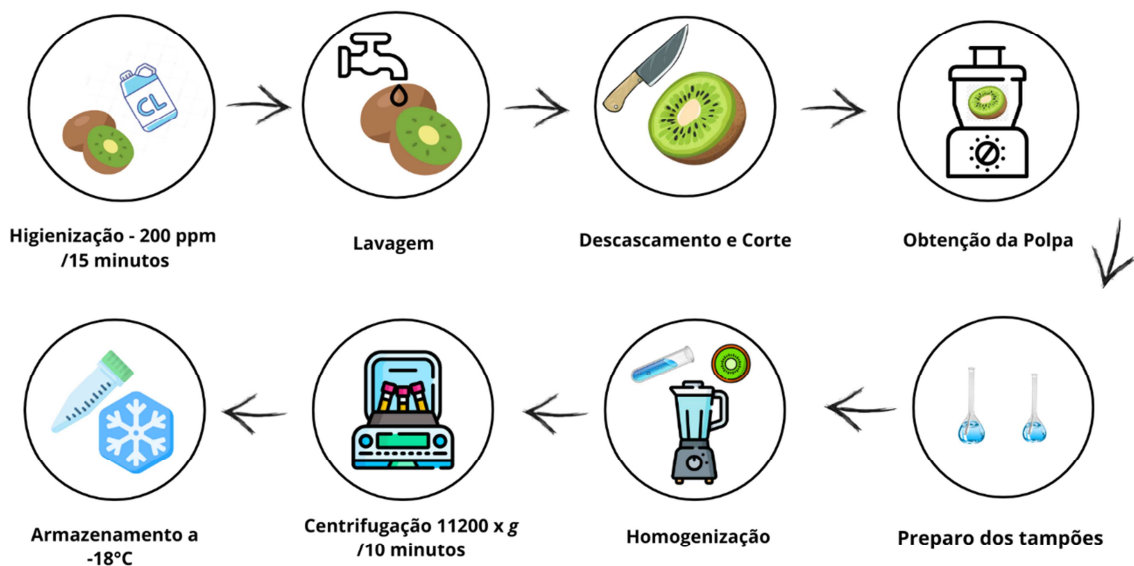
2 Método da pesquisa

Kiwis frescos (*Actinidia deliciosa* var. *Hayward*) e maduros, com um grau de maturação de aproximadamente 13 °Brix (medidos em refratômetro digital MA871, Milwaukee, Norte da Carolina, EUA), foram adquiridos em estabelecimento comercial localizado na cidade de Diamantina, Minas Gerais, Brasil (18°14'45,19"S, 43°35'45,73"O), no mês de setembro de 2024.

A preparação dos extratos foi realizada com base na metodologia descrita por Mazorra-Manzano *et al.* (2013), com adaptações. Inicialmente, os frutos foram submetidos à sanitização em solução de hipoclorito de sódio (200 ppm) por 15 minutos e, posteriormente, lavados com água potável para a remoção do cloro residual. Após a higienização, os kiwis foram descascados, fatiados de forma uniforme e triturados em multiprocessador (modelo PHP1600, Philco, Manaus-AM, Brasil), visando à obtenção da polpa.

Para a extração da enzima, seguiu-se o protocolo descrito por Sun *et al.* (2016) e ilustrado na Figura 1. A polpa obtida foi misturada em proporção 1:1 (p/v) com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0 e tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,0, e homogeneizada em liquidificador (modelo PMP, Philco, Manaus, Brasil) com potência de 1600W, na velocidade máxima. O extrato bruto foi então centrifugado (centrífuga Sorvall ST8, Thermo Fisher Scientific) a 11.200 × g, por 10 minutos, sendo o sobrenadante armazenado a -18 °C por 24 horas até a sua utilização nas análises de atividade proteolítica, que foram determinadas em triplicatas para cada ensaio avaliado.

Figura 1 – Fluxograma de produção do extrato vegetal



Fonte: elaborado pelos autores

O substrato foi preparado pela dissolução de 1% (p/v) de caseína total em dois tampões distintos: ácido aminoacético 0,1 M e citrato de sódio 0,1M (Souto, 2014). O pH dos tampões foi ajustado entre 2,6 e 8,9 por meio da adição de HCl 0,1 N e NaOH 0,1 N. Para a homogeneização, utilizou-se um agitador mecânico (TE-139, Tecal, São Paulo, Brasil).

A quantificação da atividade proteolítica foi realizada conforme método descrito por Souto (2014) em banho-maria a 50 °C, com reações compostas por 470 µL do substrato e 280 µL do extrato enzimático. Após tempos de incubação previamente determinados, alíquotas de 1 mL foram retiradas, e a reação foi interrompida com 750 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 20%. A mistura foi mantida em gelo por uma hora e, em seguida, centrifugada por 10 minutos (centrífuga Eppendorf Spinlab SL-5GR, Belo Horizonte, Brasil) a 10.000 × g. A absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro UV-Visível (modelo UV-M5 1, Bel Photonics, Monza, Itália), a 280 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 mL. A atividade proteolítica foi expressa em U.mL⁻¹.

A concentração total de proteínas do extrato bruto foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão, com uma curva padrão estabelecida na faixa de 0 a 0,05 mM ($y = -14,679x + 0,9679$; $R^2 = 0,74$). A quantificação foi realizada por meio da adição de 50 µL do extrato enzimático, previamente diluído em 200 µL de água destilada, a 500 µL da solução de Bradford. A reação foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, em ambiente protegido da luz. O branco foi composto por 250 µL de água destilada e 500 µL da solução de Bradford. As leituras foram feitas em leitor de microplacas (Elisa Loccus LMR-96, São Paulo, Brasil), a 595 nm. As concentrações proteicas foram expressas em mg.mL⁻¹ e calculadas conforme a Equação 1:

$$\text{Concentração de proteínas} = \frac{ABS}{F \times v} \quad (1)$$

onde: ABS é a absorbância obtida em nm; F é o fator do reagente de Bradford; v, o volume de enzima adicionado (mL).

Para a determinação das condições ótimas de pH e temperatura do extrato vegetal, utilizou-se a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), aplicando-se um Delineamento Composto Central

Rotacional (DCCR). As variáveis independentes foram: x_1 (temperatura) e x_2 (pH), conforme modelo matemático (Equação 2) proposto por Rodrigues e Iemma (2014):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon \quad (2)$$

em que: Y é o valor dependente (atividade proteolítica); β_0 : intercepto; β_i , β_{ii} e β_{ij} : coeficiente de regressão linear, quadrática e de interação, respectivamente; x_i e x_j : valores codificados das variáveis independentes; ε : erro experimental.

A Tabela 1 apresenta o delineamento experimental adotado para avaliar o efeito das variáveis pH e temperatura, dentro de uma faixa específica, com o intuito de determinar o ponto de máxima atividade proteolítica do extrato de kiwi em tampões fosfato e citrato. A temperatura variou de 25,7 °C a 89,3 °C, enquanto o pH foi ajustado entre 2,6 e 8,9.

Tabela 1 – Níveis codificados e reais para a avaliação da influência da temperatura e do pH na atividade proteolítica de extratos vegetais

| Ensaio | Níveis codificados | | Níveis reais | | Atividade proteolítica | |
|--------|--------------------|-------|--------------|-------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | x_1 | x_2 | X_1 (°C) | X_2 | Tampão citrato (U.mL ⁻¹) | Tampão fosfato (U.mL ⁻¹) |
| 1 | -1 | -1 | 32 | 3,5 | 0,013 ± 0,023 | 0,026 ± 0,01 |
| 2 | 1 | -1 | 80 | 3,5 | 0,287 ± 0,016 | 0,140 ± 0,02 |
| 3 | -1 | 1 | 32 | 8,0 | 0,165 ± 0,012 | 0,475 ± 0,10 |
| 4 | 1 | 1 | 80 | 8,0 | 0,073 ± 0,024 | 0,284 ± 0,01 |
| 5 | -1,41 | 0 | 25,7 | 5,8 | 0,027 ± 0,008 | 0,280 ± 0,02 |
| 6 | 1,41 | 0 | 89,3 | 5,8 | 0,166 ± 0,020 | 0,307 ± 0,02 |
| 7 | 0 | -1,41 | 57,5 | 2,6 | 0,000 ± 0,000 | 0,142 ± 0,10 |
| 8 | 0 | 1,41 | 57,5 | 8,9 | 0,500 ± 0,024 | 0,372 ± 0,10 |
| 9 | 0 | 0 | 57,5 | 5,8 | 0,468 ± 0,022 | 0,790 ± 0,02 |
| 10 | 0 | 0 | 57,5 | 5,8 | 0,443 ± 0,027 | 0,707 ± 0,02 |
| 11 | 0 | 0 | 57,5 | 5,8 | 0,432 ± 0,024 | 0,712 ± 0,04 |
| 12 | 0 | 0 | 57,5 | 5,8 | 0,437 ± 0,012 | 0,719 ± 0,01 |

Legenda: x_1 e X_1 = temperatura; x_2 e X_2 = pH do tampão

Fonte: dados da pesquisa

Os níveis das variáveis foram estabelecidos utilizando um intervalo com valores codificados de -1,41 a 1,41. Pontos intermediários (-1, 0 e 1) também foram incluídos para fins de interpolação, permitindo estimar os valores correspondentes à atividade proteolítica ao longo do intervalo analisado. A definição precisa desses pontos possibilita a identificação de possíveis fenômenos específicos nas condições avaliadas, contribuindo para uma compreensão mais aprofundada do comportamento do extrato de kiwi frente às variáveis testadas (Rodrigues; Iemma, 2014). A análise dos dados foi realizada por meio do software Statistica®, versão 10.0. Para validação do modelo, adotaram-se os critérios estatísticos de $R^2 > 0,70$ e $\alpha < 0,05$. Na etapa de otimização, consideraram-se apenas os termos estatisticamente significativos, com o objetivo de maximizar a atividade proteolítica. As condições ideais foram posteriormente validadas, utilizando-se um desvio relativo de $\pm 10\%$ entre o valor experimental observado e o valor previsto pelo modelo.

3 Resultados e discussões

Com base nos resultados obtidos durante a execução do experimento, observou-se que os valores de R^2 para ambos os tampões atenderam ao critério estabelecido ($R^2 > 0,70$). Além disso, os valores de p permaneceram abaixo de 0,05, indicando que os modelos são estatisticamente significativos. Esses resultados viabilizaram a geração dos modelos matemáticos e das superfícies de resposta referentes à atividade proteolítica do extrato de kiwi nos dois sistemas avaliados. A Tabela 2 apresenta os dados obtidos para os tampões citrato e fosfato.

Tabela 2 – Modelos matemáticos preditivos para a atividade proteolítica dos extratos vegetais em níveis codificados com significância estatística ($p < 0,05$)

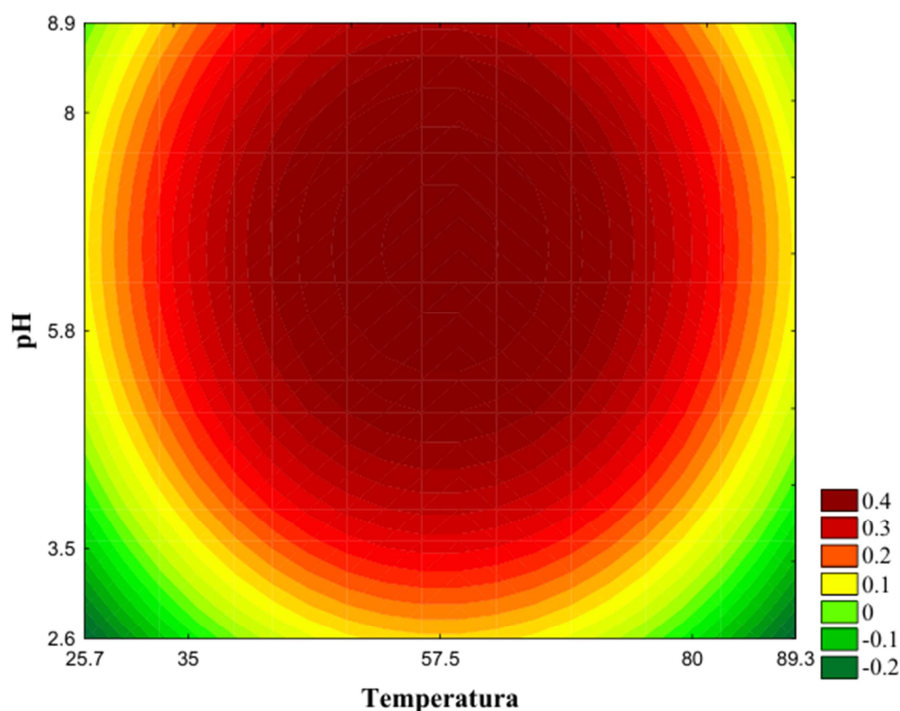
| Variável dependente | R^2 | p -valor | Modelo matemático preditivo |
|----------------------------|-------|------------|---|
| Atividade proteolítica (C) | 0,70 | $< 0,017$ | $0,44 + 0,08x_2 - 0,18x_1^2 - 0,11x_2^2$ |
| Atividade proteolítica (F) | 0,97 | $< 0,01$ | $0,73 + 0,12x_2 - 0,23x_1^2 - 0,25x_2^2 - 0,08x_1x_2$ |

Legenda: C: tampão citrato; F: tampão fosfato. Valores de $p < 0,05$, indicam significância estatística.
Fonte: dados da pesquisa

Os resultados da atividade proteolítica nos tampões citrato e fosfato revelaram que os termos quadráticos de temperatura e pH apresentaram efeito negativo ($\beta_{11} = -0,18$ e $\beta_{22} = -0,11$ para o tampão citrato; $\beta_{11} = -0,23$ e $\beta_{22} = -0,25$ para o tampão fosfato). Apenas o termo linear relacionado ao pH apresentou efeito positivo em ambos os tampões ($\beta_2 = 0,08$ para citrato e $\beta_2 = 0,12$ para fosfato), com significância estatística ($p < 0,05$), indicando que o aumento moderado do pH promoveu maior atividade enzimática.

A Figura 2 mostra a superfície de resposta gerada para o extrato de kiwi em tampão citrato, evidenciando os fenômenos observados durante o delineamento experimental. Essa representação gráfica permite visualizar detalhadamente as interações e os efeitos combinados das variáveis controladas, facilitando a interpretação do comportamento enzimático. Quando as condições experimentais combinaram valores extremos de pH e temperatura, foi observada uma expressiva redução da atividade proteolítica, sugerindo que essas condições podem comprometer a ação da enzima por meio de desnaturação.

Figura 2 – Atividade proteolítica do extrato de kiwi em tampão citrato



Fonte: dados da pesquisa

Segundo Sun *et al.* (2021), a conformação estrutural da protease pode sofrer alterações significativas ou até mesmo desnaturação irreversível sob condições de pH 8 e temperatura de 70 °C, principalmente devido a modificações em componentes da estrutura secundária da enzima.

A enzima protease apresenta conformação tridimensional estável e funcional sob condições otimizadas, como pH 5 e temperatura de 30 °C. No entanto, quando exposta a condições mais alcalinas (pH 8) e elevadas temperaturas (70 °C), sua estrutura nativa sofre modificações estruturais significativas ou até desnaturação irreversível, comprometendo a integridade molecular e, consequentemente, sua função catalítica (Sun *et al.*, 2021).

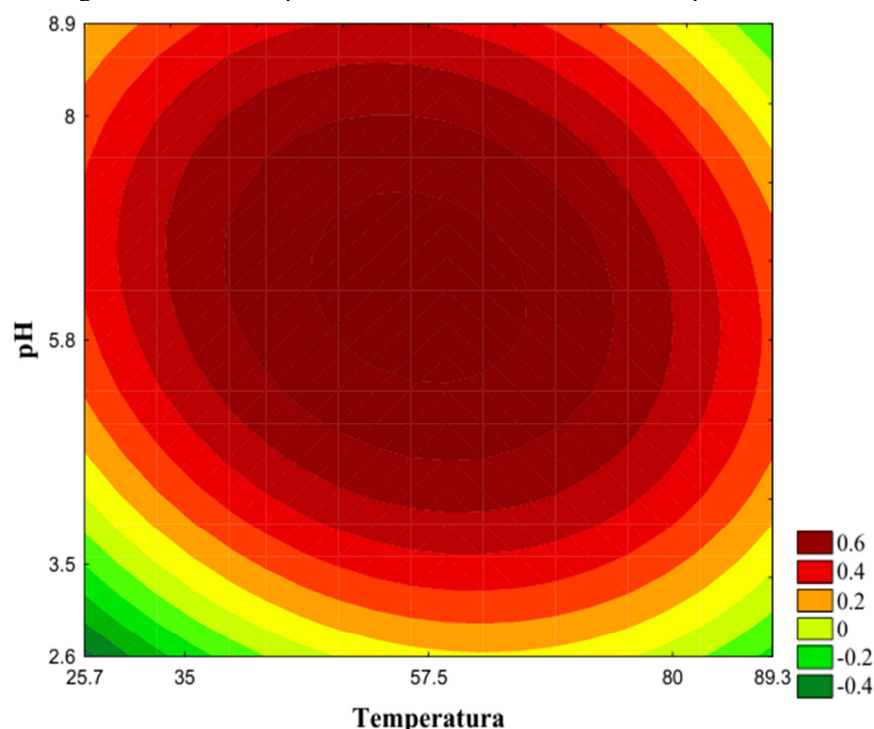
As condições ideais foram observadas em faixas intermediárias de pH e temperatura. Evidenciou-se que um pH entre 5,8 e 6,2 e temperatura entre 55 °C e 60 °C favoreceram a maior atividade proteolítica (Figura 2), corroborando Copeland (2000), que descreve o conceito de ponto ótimo de atividade enzimática, no qual a enzima assume a conformação ideal para ligação com o substrato e execução de sua função catalítica.

Por outro lado, temperaturas excessivamente elevadas promovem a desnaturação da enzima, comprometendo sua estrutura e funcionalidade. Alterações no pH também podem interferir nas cargas químicas dos grupos funcionais da enzima, dificultando a ligação ao substrato e reduzindo a eficiência catalítica (Copeland, 2000). A desnaturação pode ocorrer por variações de pH, temperatura ou pela ação simultânea de ambos, que resultam na clivagem de ligações dissulfeto e rearranjos conformacionais que afetam negativamente a estrutura tridimensional da proteína (Dehnad *et al.*, 2025).

Esses achados estão de acordo com Moreira, Castro e Oliveira (2021), que utilizaram tampão citrato por sua eficiência em manter o pH dentro de uma faixa moderada, geralmente entre 3,0 e 6,2, dependendo das concentrações.

A Figura 3 apresenta a superfície de resposta para o extrato de kiwi em tampão fosfato, evidenciando as interações entre temperatura e pH. Observou-se comportamento semelhante ao do tampão citrato, com definição de uma faixa ótima de atividade. Contudo, a atividade máxima registrada foi superior no tampão fosfato (0,734 U.mL⁻¹) em relação ao citrato (0,455 U.mL⁻¹), representando um incremento de 61,32%. Isso sugere que o tampão fosfato apresentou desempenho mais eficiente na extração da protease do kiwi, nas condições testadas.

Figura 3 – Atividade proteolítica do extrato de kiwi em tampão fosfato



Fonte: dados da pesquisa

Os menores valores de atividade enzimática no tampão fosfato também foram observados nas condições mais extremas de pH e temperatura. Os valores máximos de atividade ocorreram em faixa semelhante à do tampão citrato: pH entre 5,8 e 7,0 e temperatura entre 55 °C e 60 °C, representando o ponto de resposta máxima do sistema. Essas mudanças explicam a variação de desempenho observada nas diferentes regiões do gráfico.

Uma diferença relevante entre os tampões foi a amplitude da faixa de condições que proporcionou atividade máxima. Para o tampão fosfato, essa faixa foi significativamente mais ampla. Esse comportamento pode estar relacionado às diferentes classes de proteases, que apresentam espectros distintos de pH ótimo: ácidas (pH 2,5-3,0), neutras (pH 7,0-9,0) e alcalinas (pH 7,5-12,5), com termotolerância variando de 25 °C a 70 °C. Essas enzimas demonstram elevada plasticidade catalítica, adaptando-se a diferentes condições físico-químicas (Champasri; Phetlum; Pornchoo, 2021).

Conforme Pacheco e Moreira (2021), o tampão fosfato é amplamente reconhecido por sua robustez em diversas aplicações, devido à sua alta capacidade de tamponamento em uma ampla faixa de pH, especialmente entre 6,8 e 7,4, o que pode justificar os resultados obtidos. Essa característica pode conferir maior estabilidade e favorecer o ambiente para expressão da atividade enzimática do extrato de kiwi. Já o tampão citrato tende a ser mais indicado para sistemas com exigências específicas de pH. Os dados indicam que o tampão fosfato proporciona uma maior estabilidade ou um ambiente mais favorável para a expressão da atividade enzimática do extrato de kiwi, ampliando as condições experimentais que resultam em respostas ótimas.

Considerando que as condições $R^2 > 0,70$ e $p < 0,05$ foram satisfeitas, procedeu-se à etapa de otimização com o objetivo de identificar as melhores condições para a atividade enzimática. A Tabela 3 apresenta os resultados da otimização das variáveis temperatura e pH visando à maximização da atividade proteolítica do extrato vegetal de kiwi, utilizando os tampões citrato e fosfato.

Tabela 3 – Validação dos parâmetros otimizados para diferentes tampões na atividade proteolítica

| Tampão | Parâmetro | Alvo | Importância | Solução (valor | Solução (valor | Valor experimental | Desvio percentual |
|--------|-----------|------|-------------|----------------|----------------|--------------------|-------------------|
|--------|-----------|------|-------------|----------------|----------------|--------------------|-------------------|

| | | | | codificado) | real) | | (%) |
|---------|------------------------|-----------|---|-------------|-------|-------|-------|
| Citrato | Temperatura (°C) | Na faixa | 3 | 0 | 57,5 | – | – |
| | pH | Na faixa | 3 | +0,70 | 7,2 | – | – |
| | Atividade proteolítica | Maximizar | 3 | – | 0,448 | 0,455 | +1,54 |
| Fosfato | Temperatura (°C) | Na faixa | 3 | 0 | 57,5 | – | – |
| | pH | Na faixa | 3 | 0 | 5,75 | – | – |
| | Atividade proteolítica | Maximizar | 3 | – | 0,730 | 0,734 | +0,45 |

*Resultados para valor experimental realizado por triplicata
 Fonte: dados da pesquisa

Na Tabela 3, o campo “Alvo” indica o objetivo definido para cada variável. Para as variáveis independentes (temperatura e pH), o alvo foi estabelecido como “Na faixa”, ou seja, dentro dos limites determinados pelo escopo do estudo. Tal escolha permite a avaliação do comportamento natural dessas variáveis, sem extrapolar os extremos, o que favorece condições mais estáveis e reprodutíveis.

Para a variável dependente, denominada Atividade Proteolítica, o alvo foi definido como “Maximizar”, uma vez que o objetivo consistia em alcançar a maior atividade enzimática possível nas condições experimentais avaliadas. A importância atribuída (grau 3 em uma escala de até 5) reflete que todas as variáveis foram consideradas relevantes no modelo de otimização.

A solução proposta pelo modelo foi validada experimentalmente, com valores observados próximos aos preditos e desvios relativos inferiores a 2%, o que confirma a confiabilidade das condições otimizadas para a extração e avaliação da atividade enzimática.

Como solução, obteve-se a temperatura ótima para ambos os tampões de 57,5 °C. Contudo, observou-se variação no pH ideal conforme o tampão utilizado, resultado já esperado. A atividade proteolítica foi mais elevada em pH 7,2 para o tampão citrato e em pH 5,75 para o tampão fosfato. Para a validação dessas condições ótimas, verificou-se que o desvio relativo entre os valores de atividade proteolítica obtidos na etapa de otimização e os verificados experimentalmente foi extremamente reduzido, evidenciando a robustez e a confiabilidade dos resultados obtidos. Esses achados reforçam a eficácia da metodologia de superfície de resposta adotada neste estudo.

O tampão fosfato apresentou maior atividade proteolítica em comparação ao citrato, sugerindo sua adequação como meio ideal para o extrato de kiwi. Tal desempenho destaca seu potencial para aplicações no desenvolvimento de produtos lácteos direcionados a públicos onívoros, lacto-vegetarianos e lacto-vegetarianos, bem como para consumidores interessados em alternativas sustentáveis e inovadoras aos coagulantes convencionais, como a quimosina de origem animal. Apesar dessas vantagens, cabe destacar que a aplicação de proteases vegetais em processos industriais ainda enfrenta desafios significativos, especialmente relacionados à instabilidade térmica das enzimas e aos custos elevados envolvidos na recuperação enzimática (Afrand *et al.*, 2024).

A atividade proteolítica observada para ambos os tampões se aproximou dos valores reportados por Vinhote (2021), que, ao investigar a atividade coagulante do extrato de folhas de cinamomo no leite animal, obteve uma atividade de 0,228 U.mL⁻¹. Contudo, os dados indicam que a atividade proteolítica do extrato de kiwi foi superior àquela relatada no referido estudo.

Adicionalmente, o uso do extrato de kiwi pode conferir valor funcional aos queijos, em virtude da presença de compostos bioativos naturais na fruta. Tamiozzo (2016), por exemplo, ao aplicar coagulantes vegetais, incluindo o kiwi, na produção de tofu, reportou resultados positivos quanto à eficiência de coagulação e às propriedades finais do produto.

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para ambos os tampões avaliados.

Tabela 4 - Atividade de proteína do extrato de kiwi em diferentes tampões pela análise de Bradford

| Variável | Atividade de proteína (mg.mL ⁻¹) |
|---------------------|--|
| Kiwi tampão fosfato | 11,31 ± 0,59 |
| Kiwi tampão citrato | 12,52 ± 1,02 |

Fonte: dados da pesquisa

A concentração de proteína do extrato de kiwi apresentou variação entre os dois tampões analisados, sendo maior no tampão citrato (12,52 mg.mL⁻¹) em comparação ao tampão fosfato (11,31 mg.mL⁻¹). Essa diferença pode estar associada à capacidade de cada solução tampão em estabilizar as proteínas presentes no extrato, o que pode influenciar diretamente a interação com o reagente de Bradford e, por conseguinte, a quantificação da concentração proteica.

A atividade proteolítica do extrato bruto de kiwi apresentou desempenho altamente satisfatório nas faixas de pH e temperatura avaliadas, evidenciando comportamento enzimático expressivo e estável nas condições propostas. Esses resultados confirmam o potencial do kiwi como fonte eficiente de proteases vegetais, uma vez que a otimização do extrato demonstrou elevada atividade enzimática e condições favoráveis à sua aplicação como coagulante vegetal. Adicionalmente, os achados corroboram os resultados de Nicosia *et al.* (2022b), que reportaram forte capacidade hidrolítica e relação adequada entre atividade coagulante e proteolítica (0,754 U.mL⁻¹) do extrato de kiwi em temperaturas próximas de 40 °C e pH de 6,5, reforçando sua eficiência e aplicabilidade tecnológica em sistemas lácteos. Assim, ambos os estudos convergem ao demonstrar que a actinidina apresenta desempenho consistente, validando o extrato de kiwi como uma alternativa sustentável e funcional aos coagulantes tradicionalmente utilizados.

4 Considerações finais

O extrato de kiwi apresenta elevado potencial como alternativa sustentável de coagulante de origem vegetal. O extrato demonstrou atividade proteolítica significativa, cuja eficiência foi influenciada pelo tipo de tampão utilizado, sendo mais expressiva em tampão fosfato de sódio a 100 mM (0,734 U.mL⁻¹). Esses achados reforçam a relevância da investigação de novas fontes vegetais com aplicabilidade tecnológica na indústria de alimentos, contribuindo para a inovação e o desenvolvimento de soluções mais sustentáveis no setor.

Embora o extrato de kiwi represente uma alternativa promissora e inovadora para a indústria de laticínios, sua aplicação em escala industrial demanda investimentos em pesquisa, padronização de processos, superação de desafios técnicos e conformidade com exigências regulatórias. O desenvolvimento de tecnologias voltadas à estabilização enzimática, bem como o cultivo direcionado do kiwi com fins industriais, pode contribuir significativamente para a viabilização de seu uso em larga escala.

Os resultados obtidos indicam um caminho promissor para investigações futuras, especialmente aquelas direcionadas à otimização dos processos de extração, à estabilidade do extrato enzimático e à aplicação do coagulante vegetal derivado do kiwi em produtos lácteos, com ênfase na avaliação sensorial e na aceitabilidade dos produtos desenvolvidos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), ao Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo apoio institucional prestado ao desenvolvimento deste trabalho.

Financiamento

Os autores agradecem às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), CNPq e FAPEMIG pelo suporte financeiro.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Contribuições ao artigo

BATISTA, A. C.: concepção ou desenho do estudo/pesquisa; análise e/ou interpretação dos dados, revisão final com participação crítica e intelectual no manuscrito. **OLIVEIRA, L. H. R.:** concepção ou desenho do estudo/pesquisa; análise e/ou interpretação dos dados, revisão final com participação crítica e intelectual no manuscrito. **KETILYN, B.:** análise e/ou interpretação dos dados. **CARVALHO, H. J. M.:** concepção ou desenho do estudo/pesquisa; análise e/ou interpretação dos dados, revisão final com participação crítica e intelectual no manuscrito. **BENASSI, V. M.:** concepção ou desenho do estudo/pesquisa; revisão final com participação crítica e intelectual no manuscrito. **ROCHA, L. O. F.:** concepção ou desenho do estudo/pesquisa; análise e/ou interpretação dos dados, revisão final com participação crítica e intelectual no manuscrito. Todos os autores participaram da escrita, discussão, leitura e aprovação da versão final do artigo.

Referências

ACIMOVIĆ, M.; SOVLJANSKI, O.; SEREGELJ, V.; PEZO, L.; ZHELAZKOV, V. D.; LJUJIĆ, J.; TOMIĆ, A.; ČETKOVIĆ, G.; CANADANOVIĆ-BRUNET, J.; MILJKOVIĆ, A.; VUJISIĆ, L. Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activity of *dracocephalum moldavica* L. essential oil and hydrolate. **Plants**, 2022, v. 11, n. 7, 941, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11070941>.

AFRAND, M.; SOURINEJAD, I.; HOMAEI, A.; HEMMATI, R. Immobilization of recombinant serine protease from *Virgobacillus natechei* FarDT on amino graphene-chitosan biocompatible nanohybrid for enhancing pH and thermal stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 279, Part 2, 135254, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135254>.

ALAVI, F; MOMEN, S. Aspartic proteases from thistle flowers: Traditional coagulants used in the modern cheese industry, **International Dairy Journal**, v. 107, 104709, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104709>.

ARRUDA, M. S.; SILVA, F. O.; EGITO A. S.; SILVA T. M. S.; LIMA-FILHO J. L.; PORTO, A. L. F.; MOREIRA, K. A. New peptides obtained by hydrolysis of caseins from bovine milk by protease extracted from the latex *Jacaratia corumbensis*. **LWT – Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 73-79, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.001>.

BEY, N; DEBBEBI, H; ABIDI, F; MARZOUKI, M. N; SALAH, A. B. The non-edible parts of fennel (*Foeniculum vulgare*) as a new milk-clotting protease source. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 181-187, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.050>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254. 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

CARNE, A.; MOORE, C. H. The amino acid sequence of the tryptic peptides from actinidin, a proteolytic enzyme from the fruit of *Actinidia chinensis*. **Biochemical Journal**, v. 173, n. 1, p. 73-83, 1978. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj1730073>.

CHAMPASRI, C.; PHETLUM, S.; PORNCHOO, C. Diverse activities and biochemical properties of amylase and proteases from six freshwater fish species. **Scientific Reports**, v. 11, p. 5727, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85258-7>.

COPELAND, R. A. Chemical mechanisms in enzyme catalysis. In: COPELAND, R. A. **Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis**. p.146-150. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471220639.ch6>.

DEHNAD, D.; AKHAVAN-MAHDAVI, S.; TAVASSOLI, M.; FALSAFI, S. R.; GARAVAND, F. Impact of conventional and emerging protein denaturation methods on the properties of electrospun fibers. **Food Hydrocolloids**, v. 168, p. 111473, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2025.111473>.

ESPOSITO, M.; PIERRO, P.; DEJONGHE, W.; MARINIELLO, L.; PORTA, R. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.060>.

FARIAS, V. A.; LIMA, A. D. R.; COSTA, A. S.; FREITAS, C. D. T.; ARAÚJO, I. M. S.; GARRUTI, D. S.; FIGUEIREDO, E. A.T.; OLIVEIRA, H. D. Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit as a new source of milk-clotting cysteine proteases. **Food Research International**, v. 127, 108689, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108689>.

FGUIRI, I.; ATIGUI, M.; SBOUI, A.; SAMIRA, A.; MARZOUGUI, C.; DBARA, M.; HAMMADI, M.; KHORCHANI, T. Camel milk-clotting using plant extracts as a substitute to commercial rennet. **Journal of Chemistry**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/6680246>.

HENRIQUES, T. Valorização do kiwi (*A. deliciosa*) de baixo calibre: extração de actinidina e sua aplicação na produção de hidrolisados de glúten. 2014. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade de Aveiro, Aveiro, 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10773/14517>. Acesso em: 07 fev. 2025.

LIU, X.; WU, Y.; GUAN, R.; JIA, G.; MA, Y. C.; ZHANG, Y. Advances in research on calf rennet substitutes and their effects on cheese quality. **Food Research International**, v. 149, 110704, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110704>.

MAZORRA-MANZANO, M. A.; GUTIÉRREZ, T. C. P.; SÁNCHEZ, M. E. L.; SUAREZ, J. C. R.; LLANEZ, M. J. T.; CÓRDOVA, A. F. G.; CORDOBA, B. V. Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1902-1907, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.042>.

MOREIRA, O. B. O.; CASTRO, L. A.; OLIVEIRA, M. A. L. Cálculo e preparo de soluções tampão: guia completo usando o software PeakMaster®. **Química Nova**, v. 44, n. 6, p. 783-791, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/W67ZY48q9yJrDC69SDYkLxd>. Acesso em: 9 maio 2025.

NICOSIA, F. D.; PUGLISI, I.; PINO, A.; CAGGIA, C.; RANDAZZO, C. L. Plant milk-clotting enzymes for cheesemaking. **Foods**, v. 11, n. 6, 871, 2022a. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11060871>.

NICOSIA, F. D.; PUGLISI, I.; PINO, A.; BAGLIERI, A.; LA CAVA, R.; CAGGIA, C.; CARVALHO, A. F.; RANDAZZO, C. L. An easy and cheap kiwi-based preparation as vegetable milk

coagulant: preliminary study at the laboratory scale. **Foods**, v. 11, n. 15, 2255, 2022b. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11152255>.

NIKMARAM, N.; BUDARAJU, S.; BARBA, F. J.; LORENZO, J. M.; COX, R. B.; MALLIKARJUNAN, K.; ROOHINEJAD, S. Application of plant extracts to improve the shelf-life, nutritional and health-related properties of ready-to-eat meat products. **Meat Science**, v. 145, p. 245-255, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.031>.

ONG, G.; KASI, R.; SUBRAMANIAN, R. A review on plant extracts as natural additives in coating applications. **Progress in Organic Coatings**, v. 151, p. 106091, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2020.106091>.

PACHECO, T. F.; MOREIRA, T. D. **Guia prático para caracterização de enzimas**. Brasília. Embrapa Agroenergia, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1131161/guia-pratico-para-caracterizacao-de-enzimas>. Acesso em: 19 jul. 2025.

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 and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 1, p. 67-72, 2014.

RAMPANTI, G.; RAFFO, A.; MELINI, V.; MONETA, E.; NARDO, N.; CIVITELLI, E. S.; LEÓN, C. B.; PORTERO, L. T.; FERROCINO, I.; FRANCIOSA, I.; CARDINALI, F.; OSIMANI, A.; AQUILANTI, L. Chemical, microbiological, textural, and sensory characteristics of pilot-scale Caciocore cheese curdled with commercial *Cynara cardunculus* rennet and crude extracts from spontaneous and cultivated *Onopordum tauricum*. **Food Research International**, v. 173, Part 2, 113459, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113459>.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 3. ed. Campinas: Cárita, 2014.

SAMADI, S.; LAJAYER, B. A.; MOGHISEH, E.; COUTO, S. R. Effect of carbon nanomaterials on cell toxicity, biomass production, nutritional and active compound accumulation in plants. **Environmental Technology & Innovation**, v. 21, 101323, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101323>.

SERRA, A.; CONTE, G.; CORRALES-RETANA, L.; CASAROSA, L.; CIUCCI, F.; MELE, M. Nutraceutical and technological properties of buffalo and sheep cheese produced by the addition of kiwi juice as a coagulant. **Foods**, v. 9, n. 5, 637, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods9050637>.

SOUTO, T. B. Estudo comparativo dos fungos do complexo torula-humicola: características morfológicas, bioquímicas e moleculares importantes para diferenciação taxonômica dos componentes. 2014. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

SUN, F.; WANG, H.; LIU, Q.; KONG, B.; CHEN, Q. Effects of temperature and pH on the structure of a protease from *Lactobacillus brevis* R4 isolated from Harbin dry sausage and molecular docking of the protease to the meat proteins. **Food Bioscience**, v. 42, 101099, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101099>.

SUN, Q.; ZHANG, B.; YAN, Q.-J.; JIANG, Z.-Q. Comparative analysis on the distribution of protease activities among fruits and vegetable resources. **Food Chemistry**, v. 213, p. 708-713, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.029>.

TAMIOZZO, J. S. Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo tofu utilizando coagulantes vegetais. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) –Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2016. Disponível em: https://www.uricer.edu.br/cursos/arq_trabalhos_usuario/2858.pdf. Acesso em: 9 maio 2025.

TITO, F. R.; PEPE, A.; TONON, C. V.; DALEO, G. R.; GUEVARA, M. G. Determination and characterisation of milk-clotting activity of two *Solanum tuberosum* aspartic proteases (StAPs), **International Dairy Journal**, v. 104, 104645, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104645>.

VINHOTE, M. A. Detecção de uma protease com atividade *milk-clotting* em extrato bruto de folhas de cinamomo (*Melia azedarach*). 2021. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021. Disponível em: https://www.unirio.br/ppgd/nupsa/producao-cietifica/Monografia_Marcijane_VersaoFinal.pdf. Acesso em: 19 jul. 2025.

Revista Principia - Early View