

## POTENCIALIDADE DE EXTRATO BRUTO DE ESTIGMAS E ESTILETES DE FLORES SECUNDÁRIAS DE ALCACHOFRA (*Cynara scolymus* L.) NA COAGULAÇÃO DO LEITE

THAIS FEIDEN<sup>1\*</sup>, GIOVANA FELTES<sup>1</sup>, EUNICE VALDUGA<sup>1</sup>, JAMILE ZENI<sup>1</sup>, JULIANA STEFFENS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos

\*e-mail: thais.feiden@hotmail.com

**RESUMO** – Devido à sua diversidade e estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura, as proteases de origem vegetal são buscadas. As flores da alcachofra são uma fonte vegetal proteolítica já estudada, porém suas folhas são escassas nesse aspecto. A planta possui em sua composição compostos bioativos e enzimas. Pode ser consumida *in natura* ou processada, no entanto seu processamento gera grande quantidade de subprodutos. Os resíduos e subprodutos podem ser reaproveitados pela indústria, incluindo a extração de enzimas (proteases aspárticas) empregadas na coagulação do leite. Assim, o objetivo do presente estudo foi a utilização do extrato bruto de estigmas e estiletos liofilizados de flores secundárias da alcachofra (*Cynara scolymus* L.) obtido pela extração assistida por ultrassom na coagulação do leite. O extrato obtido na extração assistida por ultrassom, utilizando 8 mL de acetato de sódio 0,1 M (pH 5) e 1 g de amostra, em 40 min de extração apresentou atividade proteolítica de 3955,00 U/mL. O tempo e a atividade de coagulação, bem como a força do coalho, a relação atividade de coagulação do leite/atividade proteolítica (MCA/AP) e o aspecto visual da coalhada demonstraram que o extrato bruto possui potencial de aplicação na coagulação do leite, podendo ser utilizado como coagulante de origem vegetal na indústria de queijos.

### INTRODUÇÃO

A alcachofra (*Cynara scolymus* L.) é uma planta nativa das regiões mediterrâneas, cultivada em diversos países, com destaque para os maiores produtores, Itália, Egito e Espanha (Dabbou *et al.*, 2017; Gostin; Waisundara, 2019; Zayed *et al.*, 2020).

Apresenta uma inflorescência, também denominada cabeça, comestível na fase imatura (De Falco *et al.*, 2015; Zayed; Farag, 2020). A inflorescência, folhas, caules e raízes possuem em sua composição polifenóis, terpenos, fibras e polissacarídeos (de Falco *et al.*, 2015; Pandino *et al.*, 2011a).

A alcachofra pode ser consumida fresca (*in natura*) ou na forma processada (vegetal enlatado) (Gostin; Waisundara, 2019),

resultando em uma produção significativa de resíduos e subprodutos, que correspondem a aproximadamente 85% da biomassa total (folhas, raízes, brácteas externas e caules) (Llorach *et al.*, 2002; López-Molina *et al.*, 2005). Além de tudo, inflorescências de menor tamanho, que não possuem uma aparência satisfatória, são descartadas, rejeitadas ou até mesmo deixadas para amadurecer e produzir sementes. Estes subprodutos/resíduos podem ser utilizados na indústria para diversos fins (extração de compostos bioativos, enzimas utilizadas na coagulação do leite, celulose, hemicelulose) (Gostin e Waisundara, 2019; Zayed *et al.*, 2020).

A alcachofra também apresenta enzimas em sua composição, protease aspártica

(cardosinas, cinarases ou criprosinas), polifenoloxidase e peroxidase (Llorente *et al.*, 2004).

As proteases aspárticas podem ser encontradas nas cabeças, flores (Llorente *et al.*, 2004) e também nas folhas da alcachofra (Silva *et al.*, 2021). Podem ser utilizadas na produção de queijos de leite de cabra e de ovelha (Gostin; Waisundara, 2019) e na produção de tofu, produto proteico à base de soja, de grande importância principalmente para veganos (Li *et al.*, 2015; Schmidt *et al.*, 2017)

As proteases aspárticas da alcachofra possuem alta atividade de coagulação, similar a quimosina, clivando a  $\kappa$ -caseína bovina e ovina em Phe105-Met106 e a  $\kappa$ -caseína caprina em Lys116-Thr117 (Sousa; Malcata, 1998), além de elevada atividade proteolítica (Galán *et al.*, 2008). São estáveis em temperaturas menores de 45°C e pH 5,0, úteis para a coagulação do leite na fabricação de queijos (Llorente *et al.*, 1997; Llorente *et al.*, 2004)

Várias técnicas de extração podem ser utilizadas na recuperação de compostos de matrizes vegetais (Machmudah *et al.*, 2018; Molino *et al.*, 2020).

A extração assistida por ultrassom possibilita a utilização de uma variedade de solventes e a operação em temperaturas mais baixas (Rabelo *et al.*, 2016), ela se destaca como uma técnica inovadora pelo seu baixo consumo de energia e curto tempo de extração, resultando em um maior rendimento dos compostos desejados (Sabater *et al.*, 2020).

O emprego do ultrassom na recuperação de enzimas da alcachofra é pouco estudado (Silva *et al.*, 2021).

Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar a utilização do extrato bruto de estigmas e estiletos liofilizados de flores secundárias da alcachofra (*Cynara scolymus* L.) obtido pela extração assistida por ultrassom na coagulação do leite.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta e preparo da amostra

As flores secundárias de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) foram obtidas no

município de Três Arroios, Rio Grande do Sul, em dezembro de 2021, nas coordenadas: latitude 27°30'08.2"S e longitude 52°06'59.5"W. Uma amostra foi anexada ao Herbário Padre Balduino Rambo e identificada com o número HPBR 12.704.

A coleta foi realizada manualmente, cortando as inflorescências que apresentavam coloração arroxeadas, a 5 cm do caule. Após a colheita, as inflorescências foram higienizadas individualmente, na sequência os estigmas e estiletos foram separados manualmente das cabeças. Os estigmas e estiletos foram previamente secos, durante 15 dias, por meio da secagem natural, a uma temperatura média de 25 ± 2°C (temperatura média em dezembro de 2021) e armazenados em frascos de vidro âmbar com tampa. Posteriormente, a amostra foi congelada a -20°C (congelador Brastemp, modelo frost-free eletrônico 280), e liofilizada (liofilizador Edwards, modelo Modulyo), atingindo um teor de umidade de 4,5%. A amostra liofilizada foi armazenada em temperatura ambiente em frascos de vidro à prova de luz, fechados com tampa, até a realização dos experimentos

### Obtenção do extrato bruto

O extrato bruto dos estigmas e estiletos foi obtido seguindo a metodologia proposta por Esposito *et al.* (2016), com adaptações, empregando a extração assistida por ultrassom. Para a extração foi utilizado 1 g de amostra liofilizada e 8 mL de acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), em banho ultrassônico (UNIQUE, USC-1800A) com 40 kHz de frequência e 132 W de potência, a 35°C, durante 40 min.

O extrato obtido foi filtrado e centrifugado (MPW MED. INSTRUMENTS, MPW-351R) a 8.000xg por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi recolhido para a análise.

### Atividade proteolítica

A determinação da atividade proteolítica do extrato, seguiu o método proposto por Llorente *et al.* (2004), com adaptações. Para a análise, 100 µL do extrato bruto foram adicionados em 1,1 mL de uma solução de caseína 1 % (m/v) em fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,0) e incubados por 30

min a 37°C em banho termostático (UNIQUE, USC-1800A). A reação foi interrompida com a adição de 1,8 mL de ácido tricloroacético 5% (m/v), centrifugada MPW MED. INSTRUMENTS, MPW-351R) a 8500xg por 20 min e na sequência o sobrenadante foi coletado. A leitura da absorbância do sobrenadante realizada em espectrofotômetro UV-Visível (LS-7052-BIV, Logen Scientific), em 280 nm. Para o branco, a solução de ácido tricloroacético foi adicionada ao extrato antes da adição da caseína. Uma unidade de atividade enzimática foi determinada com um acréscimo de uma unidade de absorbância por minuto ou a quantidade necessária de enzima para formar 1,0  $\mu\text{mol/mL}$  de tirosina por minuto (Equação 1).

$$AP \left( \frac{U}{mL} \right) = \text{Tirosina} \left( \frac{\mu\text{mol}}{mL} \right) * \left( \frac{Fd}{V.E.} \right) * \left( \frac{V.T.}{t} \right) \quad (1)$$

Onde: Fd =: Fator de diluição; V.E.= volume de enzima; V.T.= volume total; t = tempo de incubação

#### **Avaliação do potencial de utilização do extrato bruto na coagulação do leite**

Atividade de coagulação do leite: Para a determinação da atividade de coagulação do leite seguiu-se as metodologias propostas por Llorente *et al.* (1997) e Yu *et al.* (1971), com adaptações. Foram utilizadas diferentes amostras de leite (leite UHT integral e desnatado, leite em pó integral e desnatado, com teor de gordura de 3 e 0,5%, respectivamente, adquiridas no comércio local) para os testes de coagulação, empregando o extrato bruto e quimosina (HALA) como agentes coagulantes, incubados a 37°C. Amostras com pH 6,8. Quimosina empregada como comparação com o extrato bruto, por ser utilizada na coagulação do leite.

No método de Llorente *et al.* (1997), 0,5 mL do extrato bruto ou da quimosina foram adicionados em 3 mL de uma solução de leite

em pó 10% (m/v) em cloreto de cálcio 10 mM (pH 6,0) (Testes 2, 5, 8 e 11 Tabela 1). Na metodologia de Yu *et al.* (1971), foram adicionados 0,5 mL do extrato bruto ou quimosina em 5 mL de leite (Testes 3, 6, 9 e 12, Tabela 1). Um teste controle, para cada tipo de leite (Testes 1, 4, 7 e 10, Tabela 1) foi realizado adicionando acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), no lugar do coagulante (extrato bruto ou quimosina).

O tempo de coagulação foi determinado pela observação direta da floculação e formação de gel. A atividade de coagulação do leite pode ser determinada pela Equação 2 (Silva *et al.*, 2021). Uma unidade de coagulação do leite foi determinada como a quantidade de enzima necessária para coagular 1 mL de leite a 37°C em um período de 40 minutos. Definiu-se como 400 unidades a quantidade de enzima que coagulou o substrato em 1 min.

$$MCA \left( \frac{U}{mL} \right) = \left( \frac{2400}{t} \right) * Fd \quad (2)$$

Onde: t = tempo de coagulação (s); Fd = fator de diluição.

O potencial de substituição do coalho (RSP) é a razão entre a atividade de coagulação do leite e a atividade proteolítica (AP) (Equação 3).

$$RSP = \frac{MCA}{AP} \quad (3)$$

Força do coalho: A força do coalho foi calculada pela a Equação 4.

$$F = \frac{2400.V}{t.v} \quad (4)$$

Onde: F = força do coalho; v = volume de coalho (mL); V = volume de leite (mL); t = tempo de coagulação (s).

Tabela 1: Atividade de coagulação do leite, tipos e quantidades de leite e coagulantes utilizados.

Testes	Tipo de leite	Quantidade de leite (mL)	Cloreto de cálcio	Tampão acetato de sódio (0,1 M pH 5,0) (mL)	Tipo e quantidade de coagulante
1 (controle)	Leite em pó integral 10% (m/v)	3	Solução 10 mM, pH 6,0	0,5	-
2	Leite em pó integral 10% (m/v)	3	Solução 10 mM, pH 6,0	-	0,5 mL de extrato bruto
3	Leite em pó integral 10% (m/v)	3	Solução 10 mM, pH 6,0	-	0,5 mL de quimosina
4 (controle)	Leite em pó desnatado 10% (m/v)	3	Solução 10 mM, pH 6,0	0,5	-
5	Leite em pó desnatado 10% (m/v)	3	Solução 10 mM, pH 6,0	-	0,5 mL de extrato bruto
6	Leite em pó desnatado 10% (m/v)	3	Solução 10 mM, pH 6,0	-	0,5 mL de quimosina
7 (controle)	Leite integral	5	-	0,5	-
8	Leite integral	5	-	-	0,5 mL de extrato bruto
9	Leite integral	5	-	-	0,5 mL de quimosina
10 (controle)	Leite desnatado	5	-	0,5	-
11	Leite desnatado	5	-	-	0,5 mL de extrato bruto
12	Leite desnatado	5	-	-	0,5 mL de quimosina

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Atividade Proteolítica

O extrato bruto de estigmas e estiletos de flores secundária de alcachofra obtido empregando acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) em 40 min de extração assistida por ultrassom apresentou uma atividade proteolítica de 3955,00 U/mL.

### Potencialidade de aplicação do extrato bruto na coagulação do leite

Na Tabela 2 são apresentados a atividade de coagulação do leite, o tempo de coagulação, a força de coalho e razão atividade de coagulação do leite/atividade proteolítica (MCA/AP), além disso também é

mostrado o aspecto visual da coalhada formada.







Quando a quimosina foi utilizada como coagulante, observou-se um tempo de coagulação mais curto, uma maior força do coalho e uma relação mais elevada entre a atividade de coagulação do leite e a atividade proteolítica (MCA/AP), em comparação com o uso do extrato bruto obtido por extração assistida por ultrassom com acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) em diferentes tipos de leite. Quanto à aparência da coalhada, os testes realizados com o extrato bruto (testes 5, 2, 8 e 11) resultaram em uma coalhada uniforme com uma textura firme. Quando a quimosina foi empregada, os testes 3, 9 e 12 também apresentaram coalhada uniforme e firme.







É importante ressaltar que o extrato bruto não foi submetido a nenhum processo

de concentração ou purificação e ainda assim demonstrou capacidade de coagulação. Uma alternativa para aprimorar a capacidade de coagulação desse extrato seria a aplicação de procedimentos de concentração e purificação. Mesmo assim, é viável utilizar o extrato bruto

obtido por meio do processo de extração assistida por ultrassom com acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) na coagulação do leite, podendo ser empregado como um coagulante de origem vegetal na indústria de queijos.

Tabela 2: Atividade de coagulação do leite, tempo de coagulação, força do coalho, relação MCA/AP e aspecto visual da coalhada

Testes	Atividade de Coagulação do Leite (U/mL)	Tempo de Coagulação (s)	Força de Coalho	Relação MCA/AP	Aspecto Visual da Coalhada
1 (controle)	nc	nc	nc	nc	
2	19,20	125	115,20	0,0049	
3	25,26	95	151,58	0,3368	
4 (controle)	nc	nc	nc	nc	
5	22,22	108	133,33	0,0056	
6	24,00	100	144,00	0,3200	

7 (controle)	nc	nc	nc	nc	
8	3,03	791	30,34	0,0008	
9	26,37	91	263,74	0,3516	
10 (controle)	nc	nc	nc	nc	
11	2,00	1200	20,00	0,0005	
12	26,67	90	266,67	0,3556	

A razão MCA/AP (atividade de coagulação do leite/atividade proteolítica) indica a potencialidade de aplicação da protease como coagulante na fabricação de queijos (Brutti *et al.*, 2012). A atividade de coagulação do leite (MCA) relaciona-se à capacidade da enzima de realizar a hidrólise específica da  $\kappa$ -caseína do leite, característica fundamental das proteases utilizadas na indústria de queijos (Ben Amira *et al.*, 2017b). Uma proporção maior de MCA/AP indica que a enzima apresenta capacidade maior de formar a coalhada, além de maior

rendimento de queijos e menor amargor. Já razões menores de MCA/AP indicam menor recuperação e firmeza do coalho (Afsharnejhad *et al.*, 2019). Quanto mais elevada for esta relação, mais eficiente será este coagulante na produção de queijo, resultando em um reduzido tempo de coagulação, bem como necessidade de menor quantidade de coagulante (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2019).

A rápida coagulação do leite quando o extrato bruto foi aplicado e a elevada atividade proteolítica podem ser explicadas em razão das proteases aspárticas de *C.*

*cardunculus* apresentarem atividade proteolítica mais elevada que a quimosina, ocasionando maior degradação das caseínas, produzindo queijos macios e textura amanteigada (Galán *et al.*, 2008).

O extrato bruto apresentou uma atividade proteolítica elevada (3955,00 U/mL), como consequência a atividade e o tempo de coagulação foram baixos, resultando em baixa proporção MCA/AP. Um extrato apropriado para uso como substituto do coalho deve apresentar elevada razão MCA/AP. Atividade proteolítica elevada pode resultar em queijos de maturação excessiva, em razão da elevada proteólise das proteínas do leite.

Na literatura foram encontrados tempos de coagulação similares e superiores aos do presente estudo (125 a 1200 s para o extrato bruto – Tabela 2). A atividade coagulação do leite observada neste estudo (2,00 a 22,22 U/mL para o extrato bruto – Tabela 3) são inferiores aos valores encontrados na literatura Llorente *et al.* (1997) encontraram tempo de coagulação de 480 e 7200 s para o extrato bruto de flores maduras e folhas adultas de alcachofra, respectivamente.

Silva *et al.* (2021) observaram um tempo de coagulação para extratos obtidos em extração assistida por ultrassom de 60 e 180 s e atividade de coagulação foi de 440 e 146,67 U/mL para citrato de sódio 0,1 M (pH 3,0) e acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), respectivamente.

Ben Amira *et al.* (2017a) estudaram a atividade enzimática de extratos brutos de *C. cardunculus*, alterando o pH do coalho de 3 a 6. Ao diminuir do pH do extrato para 3,0, os autores observaram um aumento na relação MCA/AP, atingindo 28,71 (MCA 2,19 CAU/mL), superior a quimosina (23,59). No entanto, em pH 6,0 foi observada a menor relação de MCA/AP (4,35), em razão da baixa atividade de coagulação (0,47 CAU/mL) e uma atividade proteolítica de 0,10 U/mL (Ben Amira *et al.*, 2017a). Os valores observados por Ben Amira *et al.* (2017a) para a razão MCA/AP foram superiores aos encontrados neste estudo (0,0005 a 0,0056 – Tabela 2), para o extrato bruto.

## CONCLUSÃO

Com base no tempo de coagulação, atividade de coagulação, força do coalho, relação MCA/AP e aparência da coalhada, é viável empregar o extrato bruto obtido por meio do processo de extração assistida por ultrassom com acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) na coagulação do leite, podendo ser utilizado na indústria de queijos como um coagulante de origem vegetal.

## REFERÊNCIAS

- AFSHARNEZHAD, M.; SHAHANGIAN, S. S.; SARIRI, R. (2019), A novel milk-clotting cysteine protease from *Ficus johannis*: Purification and characterization. International Journal of Biological Macromolecules, Vol 121, p.173–182.
- BEN AMIRA, A.; BESBES, S.; ATTIA, H.; BLECKER, C. (2017a), Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. International Journal of Food Properties, Vol 20, p.S76–S93.
- BEN AMIRA, A.; MAKHLOUF, I.; FLAVIU PETRUT, R.; FRANCIS, F.; BAUWENS, J.; ATTIA, H.; BESBES, S.; BLECKER, C. (2017b), Effect of extraction pH on techno-functional properties of crude extracts from wild cardoon (*Cynara cardunculus* L.) flowers. Food Chemistry, Vol 225, p.258–266.
- BRUTTI, C. B.; PARDO, M. F.; CAFFINI, N. O.; NATALUCCI, C. L. (2012), *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. LWT - Food Science and Technology, Vol 45, p.172–179.
- DABBOU, S.; DABBOU, S.; FLAMINI, G.; PEIRETTI, P. G.; PANDINO, G.; HELAL, A. N. (2017), Biochemical characterization and antioxidant activities of the edible part of globe artichoke cultivars grown in Tunisia. International Journal of Food Properties, Vol 20, p.S810–S819.

- DE FALCO, B.; INCERTI, G., AMATO, M.; LANZOTTI, V. (2015), Artichoke: botanical, agronomical, phytochemical, and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews*, Vol 14, p.993–1018.
- ESPOSITO, M.; DI PIERRO, P.; DEJONGHE, W.; MARINIELLO, L.; PORTA, R. (2016), Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease. *Food Chemistry*, Vol 204, p.115–121.
- GALÁN, E.; PRADOS, F.; PINO, A.; TEJADA, L.; FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (2008), Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheeses made with sheep milk. *International Dairy Journal*, Vol 18, p.93–98.
- GOSTIN, A. I.; WAISUNDARA, V. Y. (2019), Edible flowers as functional food: A review on artichoke (*Cynara cardunculus* L.). *Trends in Food Science and Technology*, Vol 86, p.381–391.
- GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, N.; BALDERRAMA-CARMONA, A.; GARCÍA-SANDOVAL, S.; RAMÍREZ-VIGIL, P.; LEAL-RAMOS, M.; GARCÍA-TRIANA, A. (2019), Proteolysis and Rheological Properties of Cream Cheese Made with a Plant-Derived Coagulant from *Solanum elaeagnifolium*. *Foods*, Vol 8, p.44.
- LI, M.; CHEN, F.; YANG, B.; LAI, S.; YANG, H.; LIU, K.; BU, G.; FU, C.; DENG, Y. (2015), Preparation of organic tofu using organic compatible magnesium chloride incorporated with polysaccharide coagulants. *Food Chemistry*, Vol 167, p.168–174.
- LLORACH, R.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; FERRERES, F. (2002), Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Byproducts as a Potential Source of Health-Promoting Antioxidant Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 50, p.3458–64.
- LLORENTE, B. E.; BRUTTI, C. B.; CAFFINI, N. O. (2004), Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 52, p.8182–8189.
- LLORENTE, B. E.; BRUTTI, C. B.; NATALUCCI, C. L.; CAFFINI, N. O. (1997), Partial characterization of a milk clotting proteinase isolated from artichoke (*Cynara scolymus* L., Asteraceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, Vol 16, p.37–42.
- LÓPEZ-MOLINA, D.; NAVARRO-MARTÍNEZ, M. D.; ROJAS-MELGAREJO, F.; HINER, A. N. P.; CHAZARRA, S.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N. (2005), Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Phytochemistry*, Vol 66, p.1476–84.
- MACHMUDAH, S.; DIONO, W.; KANDA, H.; GOTO, M. (2018), Supercritical Fluids Extraction of Valuable Compounds from Algae: Future Perspectives and Challenges. *Engineering Journal*, Vol 22, p.13–30.
- MOLINO, A.; MEHARIYA, S.; DI SANZO, G.; LAROCCA, V.; MARTINO, M.; LEONE, G. P.; MARINO, T.; CHIANESE, S.; BALDUCCHI, R.; MUSMARRA, D. (2020), Recent developments in supercritical fluid extraction of bioactive compounds from microalgae: Role of key parameters, technological achievements and challenges. *Journal of CO2 Utilization*, Vol 36, p.196–209.
- PANDINO, G.; LOMBARDO, S.; MAUROMICALE, G. (2011), Chemical and Morphological Characteristics of New Clones and Commercial Varieties of Globe Artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*). *Plant Foods for Human Nutrition*, Vol 66, p.291–297.
- RABELO, R. S.; MACHADO, M. T. C.; MARTÍNEZ, J.; HUBINGER, M. D.



- (2016), Ultrasound assisted extraction and nanofiltration of phenolic compounds from artichoke solid wastes. *Journal of Food Engineering*, Vol 178, p.170–180.
- SABATER, C.; SABATER, V.; OLANO, A.; MONTILLA, A.; CORZO, N. (2020), Ultrasound-assisted extraction of pectin from artichoke by-products. An artificial neural network approach to pectin characterisation. *Food Hydrocolloids*, Vol 98, p.105238.
- SCHMIDT, J.; CANTELLI, K. C.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J.; ZENI, J. (2017), Effects of vegetable coagulants in the production and storage of tofu. *Global Science and Technology*, Vol 10.
- SILVA, G. M. S.; COSTA, J. S.; FREIRE, J. O.; SANTOS, L. S.; BONOMO, R. C. F. (2021), Artichoke leaf extracts: Proteolytic activity, coagulant and HPLC analysis. *Ciência e Agrotecnologia*, Vol 45.
- SOUSA, M.J.; MALCATA, F. X. (1998), Proteolysis of Ovine and Caprine Caseins in Solution by Enzymatic Extracts from Flowers of *Cynara cardunculus*. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol 22, p.305–14.
- YU, J.; TAMURA, G.; ARIMA, K. (1971), Milk-clotting Enzyme from Microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, Vol 35, p.1398–401.
- ZAYED, A.; FARAG, M. A. (2020), Valorization, extraction optimization and technology advancements of artichoke biowastes: Food and non-food applications. *LWT*, Vol 132, p.109883.
- ZAYED, A.; SERAG, A.; FARAG, M. A. (2020), *Cynara cardunculus* L.: Outgoing and potential trends of phytochemical, industrial, nutritive and medicinal merits. *Journal of Functional Foods*, Vol 69, p.103937.