



HENRY LEONEL BUESO CASTRO

**EXTRATOS VEGETAIS RICOS EM PROTEASES NO
CONTROLE IN VITRO DE *Panagrellus* sp. E *Tenebrio molitor*.**

**LAVRAS-MG
2022**

HENRY LEONEL BUESO CASTRO

EXTRATOS VEGETAIS RICOS EM PROTEASES NO CONTROLE IN VITRO DE
Panagrellus sp. E Tenebrio molitor.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Filippe Elias de Freitas Soares
Orientador

LAVRAS-MG

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Castro, Henry Leonel Bueso.

Extratos vegetais ricos em proteases no controle in vitro de *Panagrellus* sp. e *Tenebrio molitor*. / Henry Leonel Bueso Castro. -
2022.

83 p.

Orientador(a): Filippe Elias de Freitas Soares.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Proteases. 2. Insetos-praga. 3. Nematoides. I. Soares, Filippe
Elias de Freitas. II. Título.

HENRY LEONEL BUESO CASTRO

EXTRATOS VEGETAIS RICOS EM PROTEASES NO CONTROLE IN VITRO DE
Panagrellus sp. E Tenebrio molitor.

PLANT EXTRACTS RICH IN PROTEASES IN THE IN VITRO CONTROL OF
Panagrellus sp. AND Tenebrio molitor.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 07 de julho de 2022

Prof^a. Dr^a. Luciana de Paula Naves, UFLA

Prof. Dr. Marcos Daniel Filgueiras Gomes, Faculdade Integra

Prof. Dr. Filippe Elias de Freitas Soares
Orientador

LAVRAS-MG
2022

*À minha mãe Zoila Amparo Castro pelo apoio e carinho em todas as etapas e
por ser meu maior exemplo de vida.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade e contribuição para o meu crescimento profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal pela oportunidade e contribuição para minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior – Brasil (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

À minha família pelo apoio e confiança, em especial a meus irmãos e à minha mãe Zoila Amparo Castro Vega.

Ao meu orientador Dr. Filippe Elias de Freitas Soares pela orientação, confiança e por tornar possível o desenvolvimento deste trabalho.

À equipe de pesquisa do laboratório de Bioquímica, em especial a Jhennifer Cristina de Souza Alves pelo auxílio nos experimentos.

À professora Rosângela Cristina Marucci e à doutoranda Joana Gladenucci do Departamento de Entomologia, pelo apoio e contribuição com os insetos de *Tenebrio molitor*.

À Professora Leila Aparecida Salles Pio, do Departamento de Agricultura pelo apoio e contribuição com os frutos de *Carica papaya*.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO GERAL

Objetivou-se com este trabalho avaliar a atividade de proteases vegetais sobre pragas agrícolas. Como fontes de proteases, foram utilizados látex de frutos de mamão verde (*Carica papaya*) e extratos de casca e coroa de frutos de abacaxi (*Ananas comosus*). Uma curva padrão de tirosina foi usada para medir a atividade enzimática e o método de Bradford para medir o teor de proteína. Papaína comercial e extratos fervidos por 2 horas foram utilizados como fonte de proteases desnaturadas para comparar o efeito com os extratos ativos. Para avaliar a atividade proteolítica sobre nematoides, foram colocados em microtubos 20 µL de cada extrato diluído em água destilada a 5 mg/mL e 15 mg/mL, mais 10 µL contendo aproximadamente 50 *Panagrellus* sp., com 6 réplicas. A porcentagem de redução foi calculada após 24 e 48 horas de incubação a 28°C. Para avaliar a toxicidade das proteases em insetos, larvas e pupas de *Tenebrio molitor* L. foram imersas por 5 segundos em extratos ativos e desnaturados diluídos a 15% (p/v) em água destilada. O número de larvas mortas foi registrado a cada 24 horas durante 10 dias. Além da mortalidade, foi registrada uma mudança na metamorfose das pupas sobreviventes. Foi preparada uma dieta artificial com farinha de trigo contendo os extratos nas doses de 0, 100, 250 e 500 mg/g de farinha. Para cada extrato, 15 larvas foram colocadas em uma placa de Petri contendo 2,5 mL de dieta e posteriormente foi seca em temperatura ambiente (18 °C ± 2 °C) durante a noite. O peso e o número de larvas mortas foram registrados a cada 24 horas e o comportamento alimentar foi avaliado sete dias após o tratamento. Os resultados indicam que os extratos avaliados causaram redução do número de *Panagrellus* sp. As proteases do látex de mamão e da papaína causaram redução (p<0,05) do número de *Panagrellus* sp. com valores de 62,41% e 92,67%, e 52,33% e 89,71% para extrato desnaturado e ativo, respectivamente. Os extratos avaliados em insetos apresentaram efeito tóxico (p<0,05) sobre as larvas de *T. molitor*, principalmente as proteases presentes na casca e coroa de abacaxi, já que não foi observada mortalidade para os extratos ativos, enquanto o látex ativo e desnaturado causaram, respectivamente, mortalidade de 98,89% e 43,33%. Foi observado efeito (p<0,05) causado pelos extratos sobre a mortalidade de pupas de *T. molitor*, mas não foi suficiente para diferenciar os extratos avaliados. O efeito (p<0,05) na metamorfose de pupas de *T. molitor* causado apenas pela papaína é atribuído às proteases, uma vez que a papaína ativa resultou em ausência de asas em 53,3% dos adultos oriundos das pupas, não sendo observada malformação causada pela papaína desnaturada. Observou-se forte redução alimentar de 77,66%, redução na taxa relativa de consumo de 0,08 mg/mg/dia, redução no crescimento de -0,05 mg/mg/dia e redução na eficiência de conversão alimentar de - 61,78% causados pelo látex de mamão, com 500 mg/g de farinha de trigo. Os resultados deste estudo demonstram que as proteases vegetais, apresentam potencial para o controle de pragas agrícolas.

Palavras-chave: Látex vegetal. Proteases. Papaína. *Carica papaya*. *Ananas comosus*. *Panagrellus* sp. *Tenebrio molitor*. Insetos-praga. Nematoides.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the activity of plant proteases on agricultural pests. As sources of proteases, latex from green papaya fruits (*Carica papaya*) and extracts from the peel and crown of pineapple fruits (*Ananas comosus*) were used. A standard tyrosine curve was used to measure enzyme activity and the Bradford method to measure protein content. Commercial papain and extracts boiled for 2 hours were used as a source of denatured proteases to compare the effect with the active extracts. To evaluate the proteolytic activity on nematodes, 20 μ L of each extract diluted in distilled water at 5 mg/mL and 15 mg/mL, plus 10 μ L containing approximately 50 *Panagrellus* sp., with 6 replicates, were placed in microtubes. The percentage of reduction was calculated after 24 and 48 hours of incubation at 28°C. To evaluate the toxicity of proteases in insects, larvae and pupae of *Tenebrio molitor* L. were immersed for 5 seconds in active and denatured extracts diluted to 15% (w/v) in distilled water. The number of dead larvae was recorded every 24 hours for 10 days. In addition to mortality, a change in the metamorphosis of surviving pupae was recorded. An artificial diet with wheat flour was prepared containing extracts at doses of 0, 100, 250 and 500 mg/g of flour. For each extract, 15 larvae were placed in a Petri dish containing 2.5 mL of diet and subsequently dried at room temperature (18 °C \pm 2 °C) overnight. The weight and number of dead larvae were recorded every 24 hours and feeding behavior was evaluated seven days after treatment. The results indicate that the evaluated extracts caused a reduction in the number of *Panagrellus* sp. The papaya latex and papain proteases caused a reduction ($p < 0.05$) in the number of *Panagrellus* sp. with values of 62.41% and 92.67%, and 52.33% and 89.71% for denatured and active extracts, respectively. The extracts evaluated in insects showed a toxic effect ($p < 0.05$) on the larvae of *T. molitor*, mainly the proteases present in the pineapple peel and crown, since no mortality was observed for the active extracts, while the active latex and denatured caused, respectively, mortality of 98.89% and 43.33%. An effect ($p < 0.05$) caused by the extracts on the mortality of *T. molitor* pupae was observed, but it was not sufficient to differentiate the extracts evaluated. The effect ($p < 0.05$) on *T. molitor* pupae metamorphosis caused only by papain is attributed to proteases, since active papain resulted in the absence of wings in 53.3% of adults from pupae, not being malformation caused by denatured papain was observed. There was a strong feed reduction of 77.66%, a reduction in the relative rate of consumption of 0.08 mg/mg/day, a reduction in growth of -0.05 mg/mg/day and a reduction in the feed conversion efficiency of - 61.78% caused by papaya latex, with 500 mg/g of wheat flour. The results of this study demonstrate that plant proteases have potential for controlling agricultural pests.

Keywords: Plant latex. Cysteine proteases. Papain. *Carica papaya*. *Ananas comosus*. *Panagrellus* sp. *Tenebrio molitor*. Insect pests. Phytopathogens. Animal parasites.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Figura 1 - Efeito da temperatura na atividade enzimática de três fontes de proteases vegetais.....	29
Figura 2 - Efeito de duas doses (5 mg/mL e 15 mg/mL) do extrato de casca de abacaxi, coroa de abacaxi, látex de mamão e da papaína na redução do número de <i>Panagrellus</i> sp. (%)	30
Figura 3 - Efeito de dois períodos de incubação (24 h e 48 h) na redução do número <i>Panagrellus</i> sp. (%), causado pelos extratos de casca de abacaxi, coroa de abacaxi, látex de mamão e papaína	31
Figura 4 - Efeito do extrato ativo e fervido da casca de abacaxi, coroa de abacaxi, látex de mamão e papaína, na redução do número de <i>Panagrellus</i> sp. (%).	32
Figura 5 - Efeito de diferentes fontes de proteases vegetais na mortalidade de larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	45
Figura 6 - Efeito de diferentes fontes de proteases vegetais na mortalidade e metamorfose de pupas de <i>Tenebrio molitor</i>	46
Figura 7 - Alimento ingerido (mg/dia) por larvas de <i>Tenebrio molitor</i> , oferecido em uma dieta artificial composta por farinha de trigo (controle) misturada com extratos ativos.....	48
Figura 8 - Índice de dissuasão alimentar (%) em larvas de <i>Tenebrio molitor</i> após ingestão de uma dieta artificial de farinha de trigo (controle) misturada com diferentes fontes de proteases ativas.....	49
Figura 9 - Taxa de consumo relativo em larvas de <i>Tenebrio molitor</i> após ingestão de uma dieta artificial de farinha de trigo (controle) misturada com diferentes fontes de proteases ativas.....	50
Figura 10 - Taxa de ganho de biomassa relativa em larvas de <i>Tenebrio molitor</i> após ingestão de uma dieta artificial de farinha de trigo (controle) misturada com diferentes fontes de proteases ativas.....	51
Figura 11 - Eficiência da conversão do alimento ingerido (%) por larvas de <i>Tenebrio molitor</i> após ingestão de uma dieta artificial de farinha de trigo (controle) misturada com diferentes fontes de proteases ativas.....	52
Figura 12 - Resumo gráfico do artigo.....	59
Figura 13 - Estrutura da papaína de <i>Carica papaya</i>	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais aplicações industriais de proteases de cisteína	Pág. 67
Tabela 2 - Proteases de cisteína com atividade biopesticidas e antiparasitária	71

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	16
REFERÊNCIAS	17
ARTIGO 1 - Atividade proteolítica do látex de mamão (<i>Carica papaya</i>) e do abacaxi (<i>Ananas comosus</i>) sobre o nematoide <i>Panagrellus</i> sp.	21
RESUMO	22
1 INTRODUÇÃO	23
2 MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1 Obtenção do extrato aquoso de abacaxi	25
2.2 Coleta e processamento do látex de mamão.....	25
2.3 Papaína.....	25
2.4 Atividade enzimática.....	25
2.5 Nematoides.....	26
2.6 Atividade nematicida.....	26
2.7 Análise estatística.....	27
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.1 Efeito da temperatura na atividade enzimática.....	28
3.2 Atividade nematicida.....	29
4 CONCLUSÃO	34
5 REFERÊNCIAS.....	35
ARTIGO 2 - Biotoxicidade do látex de mamão (<i>Carica papaya</i>) e do abacaxi (<i>Ananas comosus</i>) sobre <i>Tenebrio molitor</i> L. (Coleoptera, Tenebrionidae).....	38
RESUMO	39
1 INTRODUÇÃO	40
2 MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1 Obtenção do extrato aquoso de abacaxi	41
2.2 Coleta e processamento do látex de mamão.....	41
2.3 Mortalidade de larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	41
2.4 Mortalidade de pupas de <i>Tenebrio molitor</i>	42
2.5 Preparação de uma dieta artificial para larvas <i>Tenebrio molitor</i>	42
2.6 Avaliação do índice de dissuasão alimentar (ID) e índices nutricionais em larvas de <i>T. molitor</i> ...	43
2.7 Análise estatística.....	43

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1	Mortalidade de larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	44
3.2	Mortalidade de pupas de <i>Tenebrio molitor</i>	45
3.3	Índice de dissuasão alimentar (ID) e parâmetros nutricionais em larvas de <i>T. molitor</i>	47
4	CONCLUSÃO	53
5	REFERÊNCIAS	54
	ARTIGO 3 - Proteases de cisteína vegetal como alternativa sustentável contra pragas agrícolas e parasitas de animais.....	57
	RESUMO	58
1.	INTRODUÇÃO	60
2.	CONSEQUÊNCIAS DO USO DE PESTICIDAS SINTÉTICOS.	62
3.	INCONVENIENTES DO USO DE ANTIPARASITÁRIOS SINTÉTICOS.	64
4.	PROTEASES DE CISTEÍNA VEGETAL COMO ALTERNATIVA SUSTENTÁVEL	65
5.	PROTEASES DE CISTEÍNA VEGETAL COM ATIVIDADES BIOPESTICIDAS	68
6.	PROTEASES DE CISTEÍNA VEGETAL COM ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA.....	70
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS	73
8.	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO GERAL

Reduzir as perdas agrícolas é uma maneira eficaz de aumentar de forma sustentável a eficiência da produção agrícola para atender às necessidades de alimentos atuais e futuras. Estima-se que entre 20% e 40% de todas as perdas de produtividade das culturas são causadas por pragas e fitopatógenos (FINEGOLD et al., 2019; KASHYAP; KUMAR, 2021). Anualmente, os nematoides parasitas de plantas causam cerca de US\$ 157 bilhões de perdas à economia mundial (SIKANDAR et al., 2020), insetos-praga cerca de US\$ 70 bilhões, e as doenças das plantas custam US\$ 220 bilhões aproximadamente (MARINCHENKO, 2021). No Brasil, a economia agrícola perde anualmente cerca de US\$ 17,7 bilhões por surtos de insetos e outros artrópodes pragas nas lavouras (OLIVEIRA et al., 2014; SMITH et al., 2021).

Existem várias estratégias de controle de pragas, sendo o controle químico uma das mais utilizadas (KUMAR; SINGH, 2014), e que, embora seja eficaz para o controle de diversos tipos de pragas, com seu uso indiscriminado causando impactos negativos ao meio ambiente (YADAV et al., 2015), aos organismos benéficos como abelhas (HENRY et al., 2012) e minhocas (PELOSI et al., 2014), e à saúde humana (SABARWAL; KUMAR; SINGH, 2018). Nesse sentido, é preciso diminuir o uso de agroquímicos sintéticos e adotar estratégias alternativas que apresentem menor risco ao meio ambiente e à saúde humana (LIU; PAN; LI, 2015). Os biopesticidas são uma alternativa aos pesticidas sintéticos por serem menos tóxicos para o homem e, organismos benéficos, sem liberação de resíduos prejudiciais para o meio ambiente (MFARREJ et al., 2019; SUTEU et al., 2020; OGUNNUPEBI et al., 2020).

A fim de neutralizar o ataque de organismos herbívoros, as plantas respondem por meio de vários mecanismos de defesa. Esses mecanismos podem ser morfológicos, bioquímicos e moleculares (WAR et al., 2012). Os mecanismos bioquímicos são diversos, dinâmicos e podem ser mediados por defesas diretas e indiretas (WAR et al., 2012). Essas substâncias bioquímicas são capazes de causar repelência, inibição alimentar e reprodutiva e até causar a morte de insetos (DE JESUS et al., 2013), nematoides (TANIWIRYONO et al., 2009; GARDIANO, 2011), fungos (AL-RAHMAH et al., 2013), bactérias (GAMES et al., 2013) e vírus (BHAYAN et al., 2007).

O látex vegetal é uma emulsão viscosa produzida por células específicas (laticíferos), exsudada como mecanismo de defesa contra pragas e patógenos, e contendo metabólitos secundários e proteínas (AGRAWAL; KONNO, 2009; RAMOS et al., 2019). Devido às suas propriedades, o látex vegetal tem sido estudado para o controle de nematoides (GOMES et al., 2018), insetos-pragas (CHANDRASEKARAN et al., 2018) e parasitas animais (PEACHEY et

al., 2016; MANSUR et al., 2021). As proteases (EC 3.4) são uma classe de enzimas conhecidas por catalisarem a hidrólise de ligações peptídicas das proteínas por meio da polarização do grupo carboxila da ligação peptídica do substrato. Dependendo dos resíduos presentes no sítio ativo, elas são classificadas em quatro grupos: proteases de cisteína, proteases de serina, metaloproteases e proteases aspárticas (WARD, 2011; SEBASTIÁN et al., 2018).

Estruturalmente, as cisteíno proteases (EC.3.4.22), de tipo papaína, estão caracterizadas por um domínio típico de dobra (um domínio de α -hélice e β -folha, e a tríade catalítica Cys-His-Asn é formada na interface de dois domínios) (RAWLINGS et al., 2016; FERNÁNDEZ-LUCAS et al., 2017). As cisteíno proteases (CPs) vegetais estão relacionadas a processos fisiológicos como o desenvolvimento e maturação dos frutos, na germinação, maturação, morfogênese, biogênese celular e senescência (DOMSALLA & MELZIG, 2008; LIU et al., 2018). Além disso, as CPs desempenham um papel crítico sob o ataque herbívoro ativando os mecanismos de resistência nas plantas (MISAS-VILLAMIL et al., 2016). Por exemplo, a papaína, uma das CPs do látex, pode estar envolvida nos mecanismos de proteção induzidos por insetos herbívoros em *Carica papaya* (KONNO et al., 2004).

Nos últimos anos, as proteases surgiram como biocatalisadores padrões em muitos processos industriais em diferentes campos, como farmacêutica, medicina, fabricação de detergentes e ciência de alimentos (SEBASTIÁN et al., 2018). Entre eles, a papaína, presente no látex de mamão (*C. papaya*) e a bromelina do abacaxi (*Ananas comosus*) são, sem dúvida, as proteases vegetais mais estudadas e amplamente utilizadas na indústria alimentícia e farmacêutica em todo o mundo (FERNÁNDEZ-LUCAS et al., 2017; CHAKRABORTY et al., 2021). Embora as proteases vegetais sejam mais conhecidas na indústria, alguns autores estudaram a eficácia da bromelina do abacaxi (*Ananas comosus*), no controle de carrapatos (DOMINGUES et al., 2013; JUASOOK et al., 2018) e nematoides (DOMINGUES et al., 2013). Da mesma forma, a papaína, tem sido estudada no controle de pragas (KOVENDAN et al., 2012; PEACHEY et al., 2016; AIHETASHAM et al., 2017).

Tenebrio molitor Linnaeus, 1758, é um besouro (comprimento do corpo adulto entre 12 e 20 mm) conhecido como larva da farinha e comumente encontrado infestando produtos agrícolas armazenados (HAGSTRUM, 2017). É uma praga cosmopolita de produtos armazenados que ocorre em uma variedade de instalações e produtos, principalmente grãos e produtos amiláceos relacionados, como farelo e massas (HAGSTRUM, 2017). Apesar de ser considerada uma praga, tem sido utilizada como inseto modelo devido ao seu tamanho e facilidade de reprodução (LIU et al., 2021; SILVA et al., 2021).

A maioria dos nematoides são adaptados a estilos de vida "livres" (ou seja, não parasitas e não associados a plantas ou animais) (MALAKHOV et al., 1986). O nematoide de vida livre *Panagrellus redivivus* tem sido usado como sistema modelo desde a época de Linnaeus e é um modelo comparativo de vida livre estabelecido para *Caenorhabditis elegans* (SRINIVASAN et al., 2013). *P. redivivus* é uma espécie gonocórica (macho-fêmea) que requer ambos os sexos para reprodução e é ovovivípara, eclodindo no útero e larvas jovens que são posteriormente liberadas pela vulva (SRINIVASAN et al., 2013). Devido as suas características, as larvas de *Panagrellus* têm sido utilizadas tanto como fonte de alimento (COUTO et al., 2018), quanto para estudos que buscam alternativas sustentáveis para o controle de nematoides fitoparasitários (HERBERT-DOCTOR et al., 2016; SUFIATE et al., 2017; DE FREITAS SOARES et al., 2019).

Neste contexto, objetivou-se com este trabalho avaliar a atividade de extratos vegetais ricos em proteases no controle in vitro de *Panagrellus* sp. e *Tenebrio molitor*. A presente dissertação está estruturada em três artigos. No primeiro é abordado o efeito proteolítico das proteases da casca e coroa de abacaxi, látex de mamão e papaína no controle do nematoide *Panagrellus* sp, utilizado como modelo devido ao seu fácil cultivo, ciclo de vida curto e alta motilidade em água. No segundo, é abordado o efeito tóxico das proteases da casca e coroa de abacaxi, látex de mamão e papaína sobre *Tenebrio molitor*, um besouro conhecido como larva da farinha, também utilizado como organismo modelo. E no terceiro, é apresentado um artigo de revisão sobre as cisteíno proteases de origem vegetal (frutas/látex) como alternativas sustentáveis contra pragas agrícolas e parasitas de animais

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade de extratos vegetais ricos em proteases no controle in vitro de *Panagrellus* sp. e *Tenebrio molitor*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a porcentagem de redução do número nematoides causada por proteases do látex de *Carica papaya*, casca e coroa de *Ananas comosus* e da papaína, em juvenis do *Panagrellus* sp.;
- Determinar a taxa de mortalidade causada por proteases do látex de *C. papaya*, casca e coroa de *A. comosus* e da papaína, em larvas e pupas de *Tenebrio molitor*;
- Registrar os efeitos na metamorfose, durante a mudança do estado pupal para adultos de *T. molitor*, em decorrência da toxicidade causada por proteases do látex de *C. papaya*, casca e coroa de *A. comosus* e da papaína;
- Calcular o índice de dissuasão alimentar e o índice nutricional em larvas de *T. molitor* após a ingestão de uma dieta artificial de farinha de trigo misturada com extrato de casca e coroa de *A. comosus*, látex de *C. papaya*, e papaína;
- Fazer uma revisão sobre as cisteíno proteases de origem vegetal (frutas/látex) como alternativas sustentáveis contra pragas agrícolas e parasitas de animais.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento das perdas causadas por pragas, somado ao aumento da demanda por alimentos, estimulou a criação e adoção de agrotóxicos e antiparasitários químicos sintéticos, que apesar de práticos e eficazes, o uso indiscriminado gera poluição ambiental, resultando em danos à saúde humana. Como parte dos mecanismos de defesa, as plantas desenvolveram compostos bioquímicos que repelem o ataque de pragas e patógenos. Essas substâncias são alvo de pesquisas por representarem uma alternativa sustentável para o manejo de pragas agrícolas e parasitas de animais. Neste estudo, investigou-se o efeito de proteases presentes no fruto do abacaxi, látex de mamão e papaína, no controle do nematoide *Panagrellus sp.*, e do besouro *Tenebrio molitor*. Além disso, foram realizadas pesquisas recentes sobre o uso de proteases de cisteína para o controle de pragas agrícolas e parasitas de animais.

De acordo com os resultados deste estudo, pode-se concluir que tanto o látex de abacaxi quanto o de mamão possuem atividade nematicida contra *Panagrellus sp.* Tanto o látex de mamão quanto a papaína mostraram ter atividade proteolítica contra *Panagrellus sp.* Além disso, observou-se que o extrato de abacaxi, quando submetido a altas temperaturas, gera compostos ainda tóxicos aos nematoides. Os extratos avaliados também mostraram atividade inseticida contra *Tenebrio molitor*, afetando o comportamento alimentar das larvas, metamorfoses pupa-adulto e sobrevivência de pupas e larvas.

De acordo com os estudos revisados na literatura, as cisteíno proteases vegetais têm potencial para ser uma alternativa promissora para o controle sustentável de pragas agrícolas e parasitas de animais, uma vez que são alvo de pesquisas relacionadas ao controle de diversos tipos de pragas agrícolas e parasitas animais. Entre as alternativas promissoras às proteases de cisteína para o controle de pragas está o desenvolvimento de biopesticidas e antiparasitários como métodos sustentáveis. Por outro lado, há também o potencial do desenvolvimento de plantas resistentes a pragas e patógenos.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, Anurag A.; KONNO, Kotaro. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 40, p. 311-331, 2009. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120307>
- BHYAN, S. B. et al. Effect of plant extracts on Okra mosaic virus incidence and yield related parameters of okra. **Asian Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 3, p. 112-118, 2007. <https://doi.org/10.3923/ajar.2007.112.118>
- CHAKRABORTY, Arka Jyoti et al. Bromelain a potential bioactive compound: a comprehensive overview from a pharmacological perspective. **Life**, v. 11, n. 4, p. 317, 2021. <https://doi.org/10.3390/life11040317>
- CHANDRASEKARAN, Rajkuberan et al. *Carica papaya* (Papaya) latex: a new paradigm to combat against dengue and filariasis vectors *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **3 Biotech**, v. 8, n. 2, p. 1-10, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1105-6>
- COUTO, Márcia Valéria Silva do et al. Effects of live feed containing *Panagrellus redivivus* and water depth on growth of *Betta splendens* larvae. **Aquaculture research**, v. 49, n. 8, p. 2671-2675, 2018. <https://doi.org/10.1111/are.13727>
- DE FREITAS SOARES, Filippe Elias et al. Proteolytic and nematicidal potential of the compost colonized by *Hypsizygus marmoreus*. **Experimental parasitology**, v. 197, p. 16-19, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.12.006>
- DE JESUS, Sandra Conceição Paixão; DE MENDONÇA, Fernando Antônio Cavalcante; MOREIRA, José Osmã Teles. Atividade Inseticida e modos de ação de extratos vegetais sobre mosca branca (*Bemisia tabaci*). **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 6, n. 1, 2013. <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2013v6n1p%25p>
- DOMINGUES, Luciana Ferreira et al. In vitro activity of pineapple extracts (*Ananas comosus*, Bromeliaceae) on *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental parasitology**, v. 134, n. 3, p. 400-404, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.021>
- DOMINGUES, Luciana Ferreira et al. In vitro and in vivo evaluation of the activity of pineapple (*Ananas comosus*) on *Haemonchus contortus* in Santa Inês sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 1-2, p. 263-270, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.04.031>
- DOMSALLA, André; MELZIG, Matthias F. Occurrence and properties of proteases in plant latices. **Planta medica**, v. 74, n. 07, p. 699-711, 2008. DOI: 10.1055/s-2008-1074530
- FERNÁNDEZ-LUCAS, Jesús; CASTAÑEDA, Daniel; HORMIGO, Daniel. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 68, p. 91-101, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.017>

GAMES, P. D. et al. In vitro anti-bacterial and anti-fungal activities of hydrophilic plant defence compounds obtained from the leaves of bell pepper (*Capsicum annuum* L.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 88, n. 5, p. 551-558, 2013. <https://doi.org/10.1080/14620316.2013.11513005>

GARDIANO, C. G. et al. The effect of aqueous extracts of plant species on the multiplication of *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 4, p. 553-556, 2011. <https://doi.org/10.1590/1808-1657v78p5532011>

GOMES, E. H. et al. Role of *Synadenium grantii* latex proteases in nematicidal activity on *Meloidogyne incognita* and *Panagrellus redivivus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, p. 665-668, 2018. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.188129>

HAGSTRUM, David. Atlas of stored-product insects and mites. Elsevier, 2017.

HENRY, Mickaël et al. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. **Science**, v. 336, n. 6079, p. 348-350, 2012. DOI: 10.1126/science.121503

HERBERT-DOCTOR, Luis Alfredo et al. Insecticidal and Nematicidal Effects of *Agave tequilana* Juice against *Bemisia tabaci* and *Panagrellus redivivus*. **Southwestern Entomologist**, v. 41, n. 1, p. 27-40, 2016. <https://doi.org/10.3958/059.041.0105>

JUASOOK, Amornrat et al. Effect of pineapple extracts on the reproduction of *Rhipicephalus sanguineus* semi-engorged females. **Asian J. Anim. Vet. Adv.**, v. 13, p. 339-345, 2018. DOI: 10.3923/ajava.2018.339.345

KASHYAP, Bhuwan; KUMAR, Ratnesh. Sensing Methodologies in Agriculture for Monitoring Biotic Stress in Plants Due to Pathogens and Pests. **Inventions**, v. 6, n. 2, p. 29, 2021. <https://doi.org/10.3390/inventions6020029>

KONNO, Kotaro et al. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **The Plant Journal**, v. 37, n. 3, p. 370-378, 2004. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01968.x>

KOVENDAN, Kalimuthu et al. Bioefficacy of larvicidal and pupicidal properties of *Carica papaya* (Caricaceae) leaf extract and bacterial insecticide, spinosad, against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology research**, v. 110, n. 2, p. 669-678, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2540-z>

LIU, Changqi et al. Growth performance and nutrient composition of mealworms (*Tenebrio molitor*) fed on fresh plant materials-supplemented diets. **Foods**, v. 9, n. 2, p. 151, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9020151>

LIU, Huijuan et al. Role of papain-like cysteine proteases in plant development. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1717, 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01717>

LIU, Yongbo; PAN, Xubin; LI, Junsheng. A 1961–2010 record of fertilizer use, pesticide application and cereal yields: a review. **Agronomy for sustainable development**, v. 35, n. 1, p. 83-93, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0259-9>

MALAKHOV, U. V. et al. Nematodes: Structure, development, classification and phylogeny. **Nematodes: structure, development, classification and phylogeny.**, 1986.

MANSUR, F. A. F. et al. Developing novel anthelmintics: the stability of cysteine proteinase activity in a supernatant extract of papaya latex. **Heliyon**, v. 7, n. 10, p. e08125, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08125>

MARINCHENKO, Tatiana. Entomophages as a Perspective Direction of Plant Protection. **KnE Life Sciences**, p. 374–383-374–383, 2021. <https://doi.org/10.18502/kl.v0i0.8968>

MFARREJ, Manar Fawzi Bani; RARA, Fatimetou Mohamed. Competitive, sustainable natural pesticides. **Acta Ecologica Sinica**, v. 39, n. 2, p. 145-151, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.08.005>

MISAS-VILLAMIL, Johana C.; VAN DER HOORN, Renier AL; DOEHLEMANN, Gunther. Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity. **New Phytologist**, v. 212, n. 4, p. 902-907, 2016. <https://doi.org/10.1111/nph.14117>

OGUNNUPEBI, Temitope A. et al. Promising Natural Products in Crop Protection and Food Preservation: Basis, Advances, and Future Prospects. **International Journal of Agronomy**, v. 2020, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8840046>

OLIVEIRA, C. M. et al. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, v. 56, p. 50-54, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.10.022>

PEACHEY, L. E. et al. Papaya latex supernatant has a potent effect on the free-living stages of equid cyathostomins in vitro. **Veterinary parasitology**, v. 228, p. 23-29, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.036>

PELOSI, Céline et al. Pesticides and earthworms. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 34, n. 1, p. 199-228, 2014. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0151-z>

RAMOS, Márcio Viana et al. Laticifers, latex, and their role in plant defense. **Trends in plant science**, v. 24, n. 6, p. 553-567, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.03.006>

RAWLINGS, Neil D.; BARRETT, Alan J.; FINN, Robert. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D343-D350, 2016. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1118>

SABARWAL, Akash; KUMAR, Kunal; SINGH, Rana P. Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 63, p. 103-114, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.018>

SANTOS, Paula et al. Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 17, 2013.

SEBASTIÁN, D. 'Ipólito et al. An overview of plant Proteolytic enzymes. **Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes**, p. 1-19, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-97132-2_1

SIKANDAR, A. et al. Nematodes a risk to agriculture. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 18, n. 1, p. 1679-1690, 2020. http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1801_16791690

SILVA, Luciana Barboza et al. Development of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) on poultry litter-based diets: Effect on chemical composition of larvae. **Journal of Insect Science**, v. 21, n. 1, p. 7, 2021. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieaa145>

SMITH, David et al. CABI UK and Nagoya Protocol triggered benefit sharing. 2021. <https://dx.doi.org/10.1079/CABICOMM-62-8160>

SRINIVASAN, Jagan et al. The draft genome and transcriptome of *Panagrellus redivivus* are shaped by the harsh demands of a free-living lifestyle. **Genetics**, v. 193, n. 4, p. 1279-1295, 2013. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.148809>

SUFIAE, Bruna Leite et al. Nematicidal activity of proteases from *Euphorbia milii*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 239-241, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.03.014>

SUTEU, Daniela et al. Challenge of utilization vegetal extracts as natural plant protection products. **Applied Sciences**, v. 10, n. 24, p. 8913, 2020. <https://doi.org/10.3390/app10248913>

WARD, O. P. Proteases. **Comprehensive biotechnology**, p. 571, 2011. DOI: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00222-1

YADAV, Ishwar Chandra et al. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. **Science of the Total Environment**, v. 511, p. 123-137, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.041>

ARTIGO 1 - Atividade proteolítica do látex de mamão (*Carica papaya*) e do abacaxi (*Ananas comosus*) sobre o nematoide *Panagrellus* sp¹.

¹ Elaborado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2018)

Atividade proteolítica do látex de mamão (*Carica papaya*) e da fruta de abacaxi (*Ananas comosus*) sobre o nematoide *Panagrellus* sp.

Henry Leonel Bueso Castro, Jhennifer Cristina de Souza Alves, Filippe Elias de Freitas Soares*

Departamento de Química – Universidade Federal de Lavras (UFLA) Caixa Postal 3037 –
37200-900 – Lavras, MG – Brazil

***Correspondência:** filippe.soares@ufla.br

RESUMO

Os nematoides fitoparasitas causam grandes prejuízos à agricultura. As proteases vegetais fazem parte dos compostos produzidos como mecanismo de defesa contra pragas e patógenos. Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito proteolítico do látex de mamão (*Carica papaya*) e do abacaxi (*Ananas comosus*) sobre o nematoide *Panagrellus* sp. A casca e a coroa de frutos maduros de abacaxi foram trituradas, filtradas, centrifugadas, liofilizadas e armazenadas a -20°C até serem utilizadas nos experimentos. O látex foi coletado de frutos verdes de mamão e posteriormente, congelado, liofilizado e armazenado a -20°C até ser utilizado nos experimentos. Extratos fervidos foram utilizados como fonte de proteases desnaturadas. Papaína comercial ativa e fervida foi utilizada para avaliar o efeito comparativo entre enzima purificada e as proteases presentes nos extratos. Para avaliar a atividade proteolítica sobre nematoides, foram adicionados em microtubos 20 µL de cada extrato diluído em água destilada a 5 mg/mL e 15 mg/mL, aproximadamente 50 *Panagrellus* sp., com 6 replicatas. A porcentagem de redução do número de nematoides foi calculada após 24 e 48 horas de incubação a 28°C. Ensaios de atividade enzimática demonstraram que o látex de mamão contém uma grande quantidade de proteases (8,19 U/mg a 50 °C), em comparação com extratos de casca (0,69 U/mg a 50 °C) e coroa (0,78 U/mg a 50 °C) de abacaxi. A papaína e as proteases do látex de mamão causaram redução ($p < 0,05$) do número de nematoides de 52,33% e 89,71%, 62,41% e 92,67%, para extrato fervido e ativo, respectivamente. O efeito proteolítico sobre as larvas de *Panagrellus* sp. causado pelas proteases do látex de mamão é consistente com os ensaios de atividade enzimática, em comparação com as proteases dos extratos de abacaxi. O extrato ativo da casca de abacaxi causou, respectivamente, para as concentrações de 5 mg/mL e 15 mg/mL, reduções do número de nematoides de 40,94% e 57,14%, e o extrato ativo da coroa de abacaxi, 30,02% e 52,78%. Reduções similares do número de nematoides foram observados após 24 e 48 horas de incubação, com reduções respectivas de 32,09% e 51,98% para casca de abacaxi e 23,28% e 48,52% para a coroa de abacaxi. Os resultados demonstram que as proteases avaliadas têm efeito proteolítico sobre *Panagrellus* sp., sendo promissoras para o desenvolvimento de alternativas para o controle sustentável de nematoides.

Palavras-chave: Extrato de abacaxi, látex de mamão, proteases, papaína, *Panagrellus* sp.

1 INTRODUÇÃO

Os nematoides parasitas de plantas são invertebrados microscópicos que vivem em muitos habitats. Estima-se que cada 100 g de solo contenha entre 2.000 e 4.000 nematoides, sendo 5 vezes mais encontrado próximo à raiz das plantas. Alguns desses nematoides são fitopatogênicos e estima-se que causem perdas econômicas anuais de aproximadamente US\$ 173 bilhões em todo o mundo (GAMALERO; GLICK, 2020). Além disso, os danos às culturas causados por nematoides provavelmente aumentarão no futuro devido às mudanças climáticas (GAMALERO; GLICK, 2020). Em relação às técnicas de controle, a rotação com culturas não hospedeiras pode suprimir uma ampla gama de espécies de nematoides de forma eficaz, seguida pelo uso de corretivos orgânicos de solo. A aplicação de nematicidas químicos é eficaz quando é necessário um controle rápido de nematoides; no entanto, o uso é reavaliado devido a questões ambientais (SIVASUBRAMANIAM; HARIHARAN; ZAKEEL, 2020).

A busca por novas alternativas de controle sustentável são cada vez mais necessárias. O uso de extratos vegetais pode ser uma delas, pois estes possuem compostos com funções ecológicas em resposta ao ataque de herbívoros e organismos patogênicos (MFARREJ et al., 2019; SUTEU et al., 2020; OGUNNUPEBI et al., 2020). Atualmente, as plantas e seus subprodutos estão recebendo maior atenção como agentes defensivos contra vários parasitas vegetais, incluindo nematoides e outras pragas (KHAN et al., 2019; FORGHANI; HAJIHASSANI, 2020). Um exemplo desses compostos é o látex vegetal, exsudado como mecanismo de defesa contra pragas e patógenos (AGRAWAL; KONNO, 2009; RAMOS et al., 2019).

As proteases (EC 3.4) presentes no látex e frutos de algumas plantas, são conhecidas por catalisarem a hidrólise de ligações peptídicas das proteínas e dependendo dos resíduos presentes no sítio ativo. Estas enzimas podem ser classificadas em quatro grupos: proteases de cisteína, proteases de serina, metaloproteases e proteases aspárticas (WARD, 2011; SEBASTIÁN et al., 2018). As cisteíno proteases (EC.3.4.22) presentes no abacaxi (*Ananas comosus*) e no látex do mamão (*Carica papaya*) têm sido as mais estudadas na indústria, devido às suas propriedades de especificidade e estabilidade (WARD, 2011; CHAKRABORTY et al 2021). Além de diversas aplicações industriais, as proteases derivadas de plantas têm ganhado interesse no controle de pragas por estarem relacionadas aos mecanismos de defesa das plantas (MISAS-VILLAMIL et al., 2016).

Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito proteolítico do látex de mamão (*Carica papaya*), do abacaxi (*Ananas comosus*) e da papaína sobre o nematoide *Panagrellus*

sp., uma espécie de nematoide de vida livre que é utilizado como modelo devido ao seu fácil cultivo, ciclo de vida curto e alta motilidade em água.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do extrato aquoso de abacaxi

Frutos maduros de abacaxi foram adquiridos no mercado local de Lavras, Minas Gerais, Brasil. A preparação do extrato foi realizada seguindo a metodologia de Domingues et al. (2013), com algumas modificações. A casca e a coroa dos frutos foram retirados e, em seguida, triturados em liquidificador, utilizando-se água destilada na proporção de 1:1 (p/v) para a casca e 1:2 (p/v) para a coroa de frutos. Posteriormente, as amostras foram filtradas manualmente com uma peneira, centrifugadas a 10.000 g a 4 °C por 10 minutos, e o sobrenadante foi liofilizado por 48 horas. Após esse período de tempo o pó obtido foi armazenado a -20°C até serem utilizadas nos experimentos. Para uso nos experimentos com nematoides, o pó obtido da casca e da coroa do abacaxi foi diluído em água destilada, nas concentrações de 5 mg/mL e 15 mg/mL.

2.2 Coleta e processamento do látex de mamão

O látex de mamão foi coletado em tubos Falcon de 50 mL diretamente de frutos verdes por meio de incisões longitudinais a uma profundidade de 3 mm, utilizando uma faca de aço inoxidável. Posteriormente, o látex foi congelado, liofilizado por 48 horas e o pó obtido foi armazenado a -20°C até ser utilizado nos experimentos. Para uso nos experimentos com nematoides, o pó obtido foi diluído em água destilada, nas concentrações de 5 mg/mL e 15 mg/mL.

2.3 Papaína

A papaína foi obtida comercialmente (Dinâmica Química Contemporânea LTDA, Brasil) e, para seu uso nos experimentos com nematoides, foi diluída em água destilada, nas concentrações de 5 mg/mL e 15 mg/mL.

2.4 Atividade enzimática

A atividade de protease dos extratos de abacaxi e do látex de mamão foi mensurada de acordo com o procedimento caseinolítico adaptado de Gomes et al. (2018). Foi usada uma curva-padrão de tirosina, relacionando a absorvância e a concentração de tirosina. Os ensaios

foram feitos em microtubos, utilizando 480 μL de tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0, 500 μL de caseína a 1% (p/v) e 50 μL de amostra previamente diluída em água destilada a 10% (p/v). Os reagentes foram incubados a 30, 40, 50, 60 e 70 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético a 10% (p/v), os microtubos foram centrifugados a 10.000 g a 4 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e as leituras de absorbância foram feitas em triplicata a 280 nm com o auxílio de um espectrofotômetro. Uma unidade de protease foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μg de tirosina por minuto, nas condições do ensaio.

Para determinar a atividade enzimática por miligrama de proteína dos extratos de abacaxi e do látex de mamão, a atividade específica (U/mg) foi mensurada por meio da quantificação de proteína usando o método de Bradford (Bradford, 1976). Para a curva de calibração de Bradford usou-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão de proteína e posteriormente, a absorbância a 595 nm foi medida para 100 μL de cada extrato. A atividade enzimática da papaína comercial não foi determinada.

2.5 Nematoides

Os nematoides de vida livre *Panagrellus* sp. foram adquiridos comercialmente e posteriormente cultivados seguindo a metodologia descrita por Sufiate et al. (2017). Os nematoides foram mantidos por 7 dias em frascos contendo aveia e água destilada, e colocados no escuro a temperatura ambiente (25 $^{\circ}\text{C}$).

2.6 Atividade nematocida

Para avaliar a atividade proteolítica sobre *Panagrellus* sp., foram formados 8 grupos no total, 4 grupos contendo extrato ativo e 4 grupos com extrato desnaturado (fervido), ambos os extratos foram preparados em duas concentrações e avaliados em dois períodos de tempo. Cada grupo foi formado por 30 tubos eppendorf (6 tubos por tratamento) contendo os 4 tratamentos (casca de abacaxi, coroa de abacaxi, látex de mamão e papaína) mais o controle (água destilada). Em cada tubo foram adicionados 20 μL de extrato (ativo ou fervido) diluído em água destilada a 5 mg/mL e 15 mg/mL, mais 10 μL contendo aproximadamente 50 juvenis de *Panagrellus* sp. Os tubos contendo os extratos e nematoides foram incubados a 28 $^{\circ}\text{C}$ no escuro por 24 e 48 horas. Após esses períodos, o número total de juvenis vivos presentes em cada tubo foi contado por microscopia óptica (4x), conforme metodologia descrita por Soares et al. (2013). Juvenis

com cutícula desintegrada e sem mobilidade foram consideradas mortas. A percentagem de redução de nematoides foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Redu\c{c}ao(\%)} = \frac{(\bar{x}_{\text{juvenisvivosdocontrole}} - \bar{x}_{\text{juvenisvivosdotratamento}})}{\bar{x}_{\text{juvenisvivosdocontrole}}} \times 100$$

2.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo programa estatístico Sisvar e interpretados por análise de variância no nível de significância de 5%. A eficiência dos tratamentos na redução do número de nematoides, em comparação com o controle, foi realizada por meio do teste de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

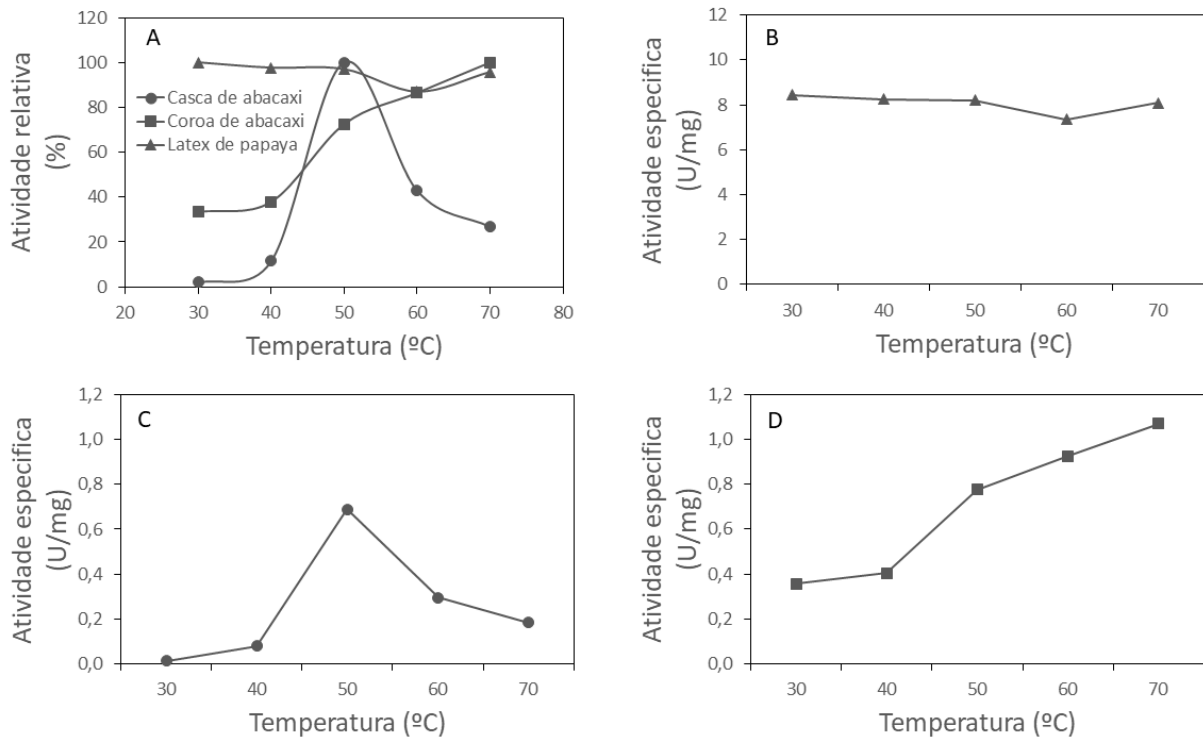
3.1 Efeito da temperatura na atividade enzimática

Os resultados de atividade enzimática dos extratos de casca de abacaxi, coroa de abacaxi e látex de mamão são mostrados na Figura 1. O extrato de casca de abacaxi (Figura 1C), apresentou atividade máxima (0,69 U/mg) a 50 °C e o extrato de coroa de abacaxi aumentou sua atividade com o aumento da temperatura, apresentando sua atividade máxima (1,071 U/mg) a 70° C, sugerindo a presença de outras enzimas, comparado com o extrato da casca. Foi relatado que o extrato de abacaxi (*Ananas comosus*) contém pelo menos oito proteases de cisteína, incluindo bromelina de caule, bromelina de frutas, ananaína e comosaína (BRITO et al., 2021). Além disso, o pH e a temperatura ideais para as enzimas presentes no abacaxi podem ser variados, por exemplo, para a bromelina do caule, o pH e a temperatura de atividade ideais são 6,5-8,0 e 55-60, respectivamente (ARSHAD et al., 2014).

Em relação à atividade enzimática do látex de mamão (Figura 1B), esta foi observada estável em diferentes temperaturas com atividade de 8,4 U/mg a 30 °C e 8,095 U/mg a 70 °C. Essa estabilidade pode estar relacionada à presença de outras enzimas com diferentes propriedades químicas. Por exemplo, papaína, caricaína e cinco clones de quimopapaína (AZARKAN et al., 2003). Comparado ao extrato de abacaxi, o látex de mamão possui maior atividade enzimática, e isso pode ser explicado porque o látex vegetal contém, além de outras substâncias tóxicas para pragas, diversos tipos de enzimas que são produzidas como mecanismo de defesa contra diversos tipos de pragas (RAMOS et al., 2019). Os testes de atividade específica foram determinados de acordo com a quantificação de proteína. A maior atividade específica do látex de mamão está relacionado com a maior quantidade de proteína (102,22 µg/mL), comparado com a quantidade de proteína determinada nos extratos de casca e coroa de abacaxi, que foram, respectivamente, de 26,18 µg/mL e 34,62 µg/mL.

A atividade enzimática é influenciada por vários fatores, e entre os mais influentes estão o pH da solução e a temperatura do meio. Em relação às temperaturas, as duas propriedades estabelecidas das enzimas são sua energia de ativação e sua estabilidade térmica. Mantendo os demais fatores constantes, a atividade máxima da enzima é alcançada em uma determinada temperatura, e variações extremas podem reduzir sua atividade. Baixas temperaturas reduzem a energia de ativação e altas temperaturas podem causar problemas estruturais, fazendo com que as enzimas percam sua conformação funcional (NELSON; COX, 2018).

Figura 1 - Efeito da temperatura na atividade de protease de três fontes de proteases vegetais.



Legenda: A). Comparação da atividade relativa (%) de diferentes fontes de proteases vegetais. (B-D). Atividade enzimática específica (U/mg) do látex de mamão (B), casca de abacaxi (C) e coroa de abacaxi (D). O ensaio foi feito com tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0. Foi usada uma curva-padrão de tirosina e a proteína foi quantificada pelo método de Bradford para medir a atividade específica. Uma unidade de protease foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µg de tirosina por minuto.

Fonte: Do Autor (2022).

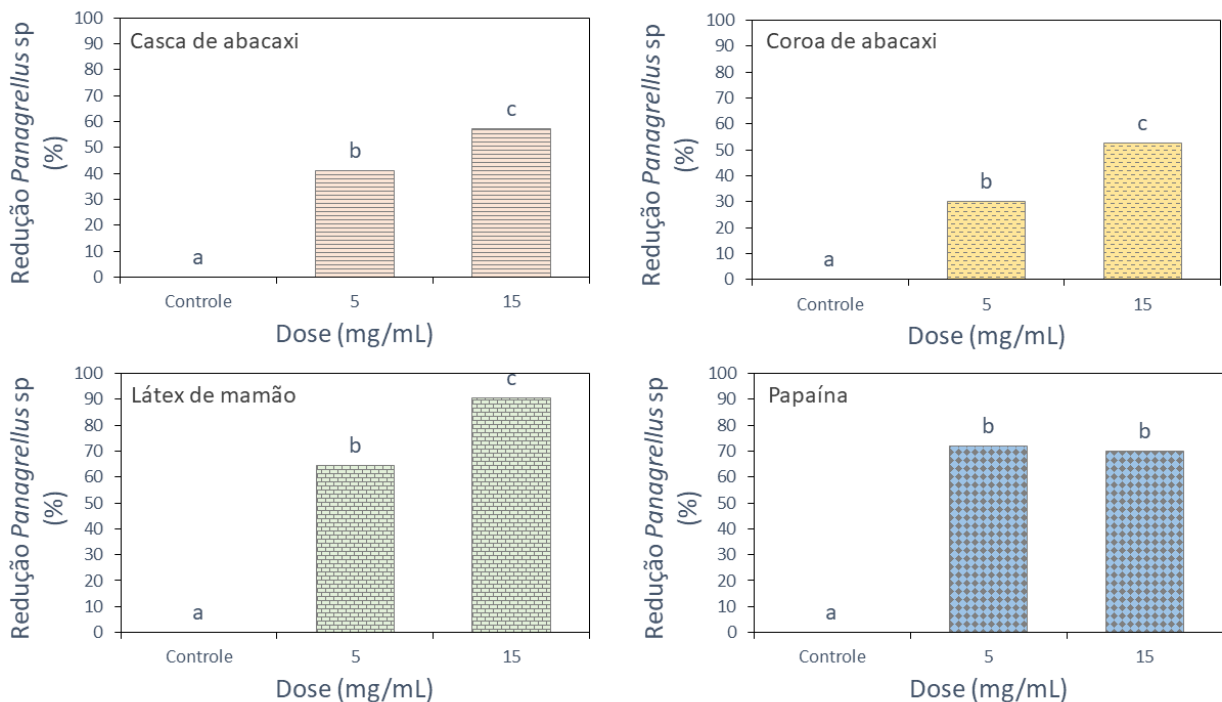
3.2 Atividade nematicida

Os extratos avaliados neste estudo causaram redução ($P < 0,05$) do número de juvenis de *Panagrellus* sp., em relação ao grupo controle, tanto para as diferentes doses (Figura 2) quanto para os tempos de incubação (Figura 3). Da mesma forma, foi observada uma redução ($P < 0,05$) do número de nematoides nos grupos tratados com extratos ativos, em relação aos grupos fervidos (Figura 4). No entanto, os grupos fervidos não foram diferentes do grupo controle, sugerindo que ainda continham proteases ativas ou outros compostos tóxicos para *Panagrellus* sp.

Em relação às doses avaliadas (Figura 2), foi observado efeito nematicida semelhante nos extratos de abacaxi. O extrato da casca causou para as doses de 5 mg/mL e 15 mg/mL, reduções de 40,94% e 57,14%, respectivamente. O extrato de coroa de abacaxi reduziu 30,02% e 52,78% para as doses de 5 mg/mL e 15 mg/mL, respectivamente. O látex de mamão reduziu

o *Panagrellus* 64,54% para a dose de 5 mg/mL e de 90,54% para a dose de 15 mg/mL. Em relação à papaína, apesar de ter causado redução ($P<0,05$) do número de nematoides em relação ao grupo controle (72,02% para 5 mg/mL e 70,02% para 15 mg/mL), não houve diferença significativa entre as duas concentrações.

Figura 2 - Efeito de duas doses (5 mg/mL e 15 mg/mL) do extrato de casca de abacaxi, coroa de abacaxi, látex de mamão e da papaína na redução do número de juvenis de *Panagrellus* sp. (%)



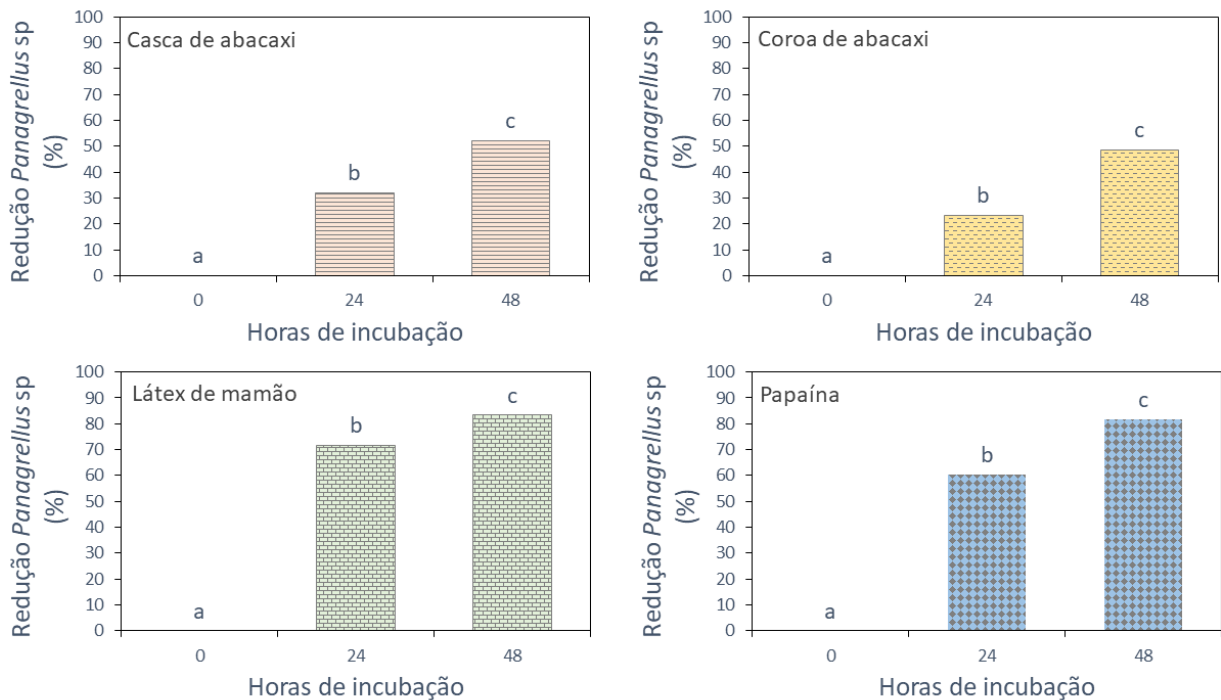
Legenda: Os dados representam cerca de 50 nematoides por tubo com 6 réplicas, em contato com 20 μ L de extrato, incubados a 28°C. O controle representa os nematoides em contato com apenas água destilada. O número total de larvas vivas foi contado por microscopia óptica (4x) e em seguida, a porcentagem de redução foi calculada. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Fonte: Do Autor (2022).

O efeito nematicida aumentou com o tempo de incubação, uma vez que o período de 24h após tratamento, além de ter causado redução ($P<0,05$) comparado com o tempo zero, também causou redução ($P<0,05$) do número de juvenis de *Panagrellus* sp. comparado com 48h após tratamento. Isso aconteceu com todos os extratos avaliados (Figura 3). Após 24 horas de incubação, os extratos de casca de abacaxi, coroa de abacaxi, látex de mamão e papaína reduziram os nematoides em 32,09%, 23,28%, 71,78% e 60,34%, respectivamente. Já a incubação por 48 horas provocou reduções de 51,98%, 48,52%, 83,30% e 81,70%, respectivamente. Comportamento semelhante foi observado por Sufiate et al. (2017) em um

estudo de caracterização de proteases presentes no látex de *Euphorbia milii*, no qual avaliou o potencial nematicida dessas enzimas sobre *Panagrellus* sp., encontrando uma redução ($P < 0,01$) do número de nematoides de 65,59% e 96,46% em 24h e 48h, respectivamente.

Figura 3 - Efeito de dois períodos de incubação (24 h e 48 h) na redução do número de juvenis de *Panagrellus* sp. (%), causado pelos extratos de casca de abacaxi, coroa de abacaxi, látex de mamão e papaína.



Legenda: Os dados representam cerca de 50 nematoides por tubo com 6 réplicas, em contato com 20 μL de extrato, incubados a 28°C. O controle representa os nematoides em contato com apenas água destilada. O número total de larvas vivas foi contado por microscopia óptica (4x) e em seguida, a porcentagem de redução foi calculada. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

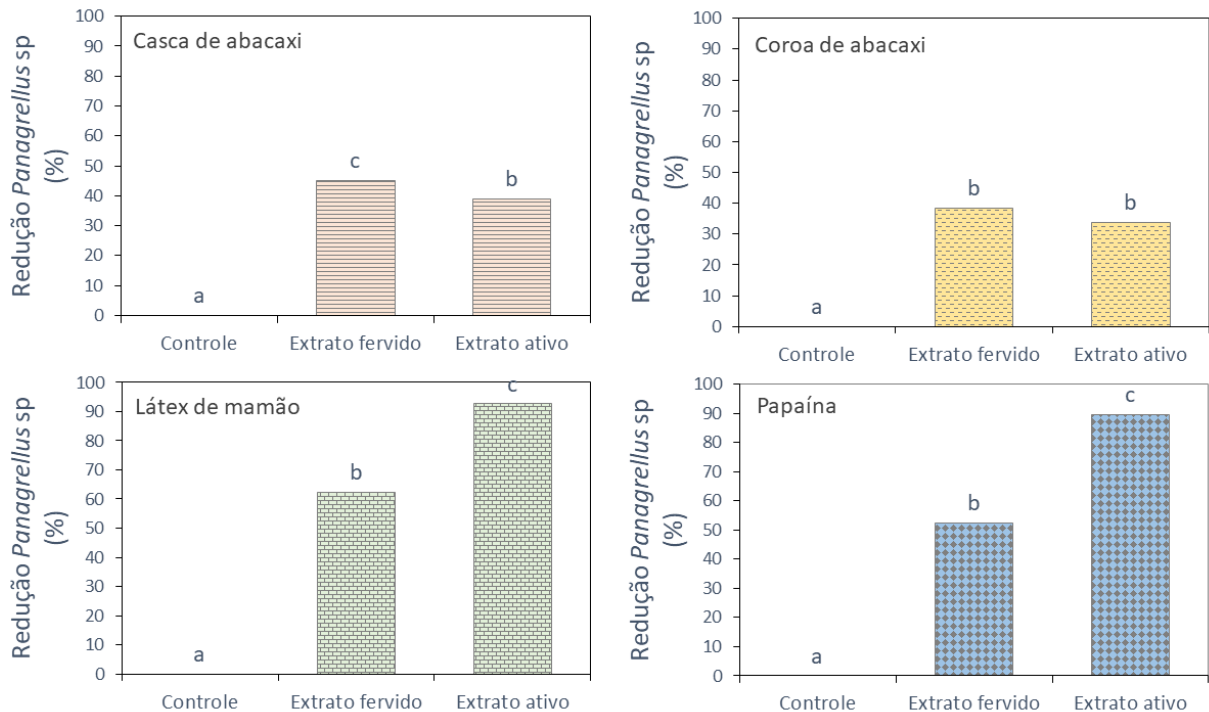
Fonte: Do Autor (2022).

Para avaliar o efeito das proteases presentes nos extratos avaliados sobre *Panagrellus* sp., um grupo de nematoides foi incubado nas mesmas condições, mas com extratos fervidos. No entanto, não foi realizado um experimento para verificar a desnaturação completa das enzimas presentes nos extratos. Conforme observado na Figura 4, nenhum dos extratos fervidos foi igual ($P < 0,05$) ao grupo controle. Contudo, o látex de mamão fervido e a papaína fervida, provocaram uma redução do número de juvenis de *Panagrellus* sp. ($P < 0,05$) diferente da redução causada pelos extratos ativos, com reduções causadas pelo látex de mamão fervido e ativo de 62,42% e 92,67%, respectivamente. A papaína fervida causou redução de 52,33% e a papaína ativa reduziu 89,71%. Comparado com a papaína, uma enzima pura, o látex de mamão,

além de proteases, contém diversas substâncias como alcaloides, terpenóides, taninos, flavonoides e fenóis (CHANDRASEKARAN et al., 2018; NAKHATE et al; 2019) que poderiam ter efeito tóxico sobre os nematoides, mesmo com as enzimas desnaturadas.

Os extratos de casca e abacaxi fervidos, além de terem causado redução significativa ($P < 0,05$) sobre juvenis de *Panagrellus sp.*, diferentemente do grupo controle, foram estatisticamente iguais ao grupo de extratos ativos ($P < 0,05$). Com exceção da casca de abacaxi fervida, que inclusive provocou uma redução maior de *Panagrellus sp.* do que o extrato ativo.

Figura 4 - Efeito do extrato ativo e fervido da casca de abacaxi, coroa de abacaxi, látex de mamão e papaína, na redução do número de juvenis de *Panagrellus sp.* (%).



Legenda: Os dados representam cerca de 50 nematoides por tubo com 6 réplicas, em contato com 20 μ L de extrato, incubados a 28°C. O controle representa os nematoides em contato com apenas água destilada. O número total de larvas vivas foi contado por microscopia óptica (4x) e em seguida, a porcentagem de redução foi calculada. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Fonte: Do Autor (2022).

Os nematoides estão envoltos em um exoesqueleto (conhecido como cutícula), uma estrutura chave para o sucesso e diversidade das espécies de nematoides. Esta complexa matriz extracelular cobre a camada mais externa das células e é necessária para a forma do corpo, movimento e funciona como a interface primária com o ambiente. A cutícula é composta por dois importantes tipos de proteínas estruturais, colágenos e cuticlinas (PAGE et al., 2014). Como demonstrado neste estudo, foi relatado que as cisteíno proteases derivadas de plantas como

mamão, abacaxi, figo e kiwi, atacam nematoides digerindo a cutícula, levando à ruptura e morte do verme (NJOM et al., 2021).

O efeito nematicida causado pelos extratos da casca e coroa de abacaxi, látex de mamão ricos em proteases sobre nematoides de vida livre do gênero *Panagrellus* é um indicativo de ação também em outras espécies de nematoides como fitoparasitas ou parasitas de animais como sugerido em diferentes estudos (HERBERT-DOCTOR et al., 2016; SUFIATE et al., 2017; DE FREITAS SOARES et al., 2019). Assim, é necessário realizar novas pesquisas a nível de campo ou in vivo para avaliar o efeito nematicida dos extratos da casca e coroa de abacaxi e látex de mamão, sobre nematoides fitoparasitas.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que tanto os extratos da casca e coroa de abacaxi quanto o látex de mamão e papaína possuem atividade nematicida contra *Panagrellus* sp. Além disso, foi demonstrado que as proteases presentes no látex de mamão e da papaína pura, apresentam potencial proteolítico sobre *Panagrellus* sp. já que causaram redução do número de nematoides diferente ($P < 0,05$) quando comparado aos resultados dos tratamentos que utilizaram extrato fervido ou ativo. Por outro lado, foi observado que o extrato de abacaxi quando submetido a temperaturas altas, gera compostos ainda tóxicos para os nematoides, abrindo a possibilidade de novas pesquisas.

5 REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, Anurag A.; KONNO, Kotaro. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 40, p. 311-331, 2009. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120307>
- ARSHAD, Zatul Iffah Mohd et al. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 17, p. 7283-7297, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5889-y>
- AYENI, Augustine et al. Production of Citric Acid from the Fermentation of Pineapple Waste by. **The Open Chemical Engineering Journal**, v. 13, n. 1, 2019. DOI: 10.2174/1874123101913010088
- AZARKAN, Mohamed et al. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. **Journal of Chromatography B**, v. 790, n. 1-2, p. 229-238, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00084-9](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00084-9)
- BRADFORD, M.M.A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for protein utilizing the principle of protein –dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRITO, Adrienne MM et al. Collagenase activity of bromelain immobilized at gold nanoparticle interfaces for therapeutic applications. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 1143, 2021. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081143>
- CHAKRABORTY, Arka Jyoti et al. Bromelain a potential bioactive compound: a comprehensive overview from a pharmacological perspective. **Life**, v. 11, n. 4, p. 317, 2021. <https://doi.org/10.3390/life11040317>
- CHANDRASEKARAN, Rajkuberan et al. *Carica papaya* (Papaya) latex: a new paradigm to combat against dengue and filariasis vectors *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **3 Biotech**, v. 8, n. 2, p. 1-10, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1105-6>
- DE FREITAS SOARES, Filippe Elias et al. Proteolytic and nematicidal potential of the compost colonized by *Hypsizygus marmoreus*. **Experimental parasitology**, v. 197, p. 16-19, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.12.006>
- DOMINGUES, Luciana Ferreira et al. In vitro activity of pineapple extracts (*Ananas comosus*, Bromeliaceae) on *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental parasitology**, v. 134, n. 3, p. 400-404, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.021>
- FORGHANI, Fereidoun; HAJIHASSANI, Abolfazl. Recent advances in the development of environmentally benign treatments to control root-knot nematodes. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1125, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01125>

GAMALERO, Elisa; GLICK, Bernard R. The use of plant growth-promoting bacteria to prevent nematode damage to plants. **Biology**, v. 9, n. 11, p. 381, 2020.

<https://doi.org/10.3390/biology9110381>

GOMES, E. H. et al. Role of *Synadenium grantii* latex proteases in nematicidal activity on *Meloidogyne incognita* and *Panagrellus redivivus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, p. 665-668, 2018. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.188129>

HERBERT-DOCTOR, Luis Alfredo et al. Insecticidal and Nematicidal Effects of *Agave tequilana* Juice against *Bemisia tabaci* and *Panagrellus redivivus*. **Southwestern Entomologist**, v. 41, n. 1, p. 27-40, 2016. <https://doi.org/10.3958/059.041.0105>

KHAN, Faryad et al. Evaluation of the nematicidal potential of some botanicals against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infected carrot: In vitro and greenhouse study. **Current Plant Biology**, v. 20, p. 100115, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2019.100115>

MFARREJ, Manar Fawzi Bani; RARA, Fatimetou Mohamed. Competitive, sustainable natural pesticides. **Acta Ecologica Sinica**, v. 39, n. 2, p. 145-151, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.08.005>

MISAS-VILLAMIL, Johana C.; VAN DER HOORN, Renier AL; DOEHLEMANN, Gunther. Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity. **New Phytologist**, v. 212, n. 4, p. 902-907, 2016. <https://doi.org/10.1111/nph.14117>

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. Artmed Editora, 2018.

NJOM, Victor S. et al. The effects of plant cysteine proteinases on the nematode cuticle. **Parasites & vectors**, v. 14, n. 1, p. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04800-8>

OGUNNUPEBI, Temitope A. et al. Promising Natural Products in Crop Protection and Food Preservation: Basis, Advances, and Future Prospects. **International Journal of Agronomy**, v. 2020, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8840046>

PAGE, Antony P. et al. Enzymology of the nematode cuticle: A potential drug target? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 2, p. 133-141, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.05.003>

RAMOS, Márcio Viana et al. Laticifers, latex, and their role in plant defense. **Trends in plant science**, v. 24, n. 6, p. 553-567, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.03.006>

SIVASUBRAMANIAM, Nishanthi; HARIHARAN, Ganeshamoorthy; ZAKEEL, Mohamed Cassim Mohamed. Sustainable Management of Plant-Parasitic Nematodes: An Overview from Conventional Practices to Modern Techniques. **Management of Phytonematodes: Recent Advances and Future Challenges**, p. 353-399, 2020. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4087-5_16

SOARES, Filipe EF et al. Nematicidal activity of three novel extracellular proteases of the nematophagous fungus *Monacrosporium sinense*. **Parasitology research**, v. 112, n. 4, p. 1557-1565, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3304-8>

SUFIATE, Bruna Leite et al. Nematicidal activity of proteases from *Euphorbia milii*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 239-241, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.03.014>

SUTEU, Daniela et al. Challenge of utilization vegetal extracts as natural plant protection products. **Applied Sciences**, v. 10, n. 24, p. 8913, 2020. <https://doi.org/10.3390/app10248913>

ARTIGO 2 - Biotoxicidade do látex de mamão (*Carica papaya*) e do abacaxi (*Ananas comosus*) sobre *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae)²

²Elaborado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2018)

Biotoxicidade do látex de mamão (*Carica papaya*) e do abacaxi (*Ananas comosus*) sobre *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae)

Henry Leonel Bueso Castro¹, Jhennifer Cristina de Souza Alves¹, Joana Gladenucci²,
Rosângela Cristina Marucci², Filipe Elias de Freitas Soares^{1*}

¹Departamento de Química – Universidade Federal de Lavras (UFLA) Caixa Postal 3037 – 37200-900 – Lavras, MG – Brazil

²Departamento de Entomologia – Universidade Federal de Lavras (UFLA) Caixa Postal 3037 – 37200-900 – Lavras, MG – Brazil

* **Correspondência:** filipe.soares@ufla.br

RESUMO

Os insetos-praga são os principais competidores do homem pelos recursos gerados pela agricultura. Objetivou-se com este estudo avaliar a biotoxicidade do látex de mamão (*Carica papaya*) e de extratos de abacaxi (*Ananas comosus*) em *Tenebrio molitor* L. Casca e coroa de frutos de abacaxi foram trituradas, filtradas, congeladas, liofilizadas e armazenadas a -20 °C. O látex de mamão foi coletado de frutos verdes e processado da mesma forma que o abacaxi. Papaína comercial e extratos fervidos foram usados em comparação com extratos ativos. Para avaliar a biotoxicidade, 30 larvas de *T. molitor* foram imersas por 5 segundos, a cada 24 h por 3 dias, em extratos ativos e fervidos, diluídos a 15% (p/v) em água destilada. O número de larvas mortas foi registrado a cada 24 horas durante 10 dias. O mesmo experimento foi realizado com grupos de 10 pupas e, além da mortalidade, foram registradas deformações durante a metamorfose das pupas sobreviventes. Além do teste de imersão, uma dieta artificial foi preparada com os extratos ativos nas doses de 0, 100, 250 e 500 mg/g de farinha de trigo. Quinze larvas foram adicionadas por placa contendo 2,5 mL da dieta. O número de larvas mortas foi registrado a cada 24 horas, e os pesos nos dias 0 e 7 para avaliar o comportamento alimentar e índices nutricionais. Um efeito tóxico ($P < 0,05$) foi observado sobre as larvas, causado pelo látex ativo e fervido, com mortalidade de 98,89% e 43,33%, respectivamente. No entanto, o látex fervido, apesar de ter causado menor mortalidade que o látex ativo, não foi igual do grupo controle, sugerindo que o látex de mamão, além de enzimas, contém outras substâncias tóxicas. Apenas o extrato fervido da casca e coroa de abacaxi foi semelhante ($p < 0,05$) ao grupo controle. Observou-se um efeito ($P < 0,05$) causado pelos extratos na mortalidade das pupas, com exceção da papaína ativa, que apesar de ter causado baixa mortalidade, impediu o desenvolvimento das asas em 53% das pupas convertidas em adultos. A dieta não causou mortalidade sobre as larvas, porém, observou-se forte dissuasão alimentar (77,66%), redução na taxa relativa de consumo (0,08 mg/mg/dia), redução no ganho de biomassa (-0,05 mg/mg/dia) e redução na eficiência de conversão alimentar (-61,78%), causada pelo látex ativo. Os resultados deste estudo demonstram que proteases derivadas de plantas apresentam biotoxicidade sobre o besouro *T. molitor*, o que pode ser promissor para o desenvolvimento de métodos de controle sustentáveis contra esse tipo de praga.

Palavras-chave: Extratos vegetais, látex, proteases, papaína, *Tenebrio molitor*.

1 INTRODUÇÃO

O aumento da demanda por alimentos levou à adoção de produtos químicos sintéticos como uma estratégia rápida e eficaz de controle de pragas. No entanto, esses produtos químicos têm contribuído para a poluição ambiental (YADAV et al., 2015). Ao mesmo tempo, até 40% das lavouras são afetadas por pragas e doenças vegetais, gerando custos mundiais cerca de US\$ 220 bilhões por ano, e a invasão de insetos gera US\$ 70 bilhões (MARINCHENKO, 2021) de prejuízo. Estima-se que no Brasil existem aproximadamente 447 espécies de insetos-praga que afetam as principais lavouras do país (ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009). Dentre as ordens existentes, aquelas com maior número de espécies de pragas são: hemíptera (31,1%), lepidóptera (25,5%), e coleóptera, com 23,4% (ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009).

As plantas produzem compostos químicos como mecanismos de defesa (YACTAYO-CHANG et al., 2020) e sua influência na sobrevivência de organismos considerados pragas têm sido pesquisada (SUTEU et al., 2020; OGUNNUPEBI et al., 2020). Esses compostos vegetais podem agir como ovicidas, repelentes, fago-inibitórios, antinutricionais e entomotóxicos (SANTOS, 2013; PEACHEY et al., 2016; CHANDRASEKARAN et al., 2018; LIMA et al., 2020). Um claro exemplo desses compostos é o látex (ABARCA; KLINKHAMER; CHOI, 2019), uma emulsão pegajosa produzida por células específicas (laticíferos) exsudadas quando as plantas sofrem lesões (AGRAWAL; KONNO, 2011; RAMOS et al., 2019). O látex contém substâncias tóxicas contra diversas pragas. Um exemplo desses compostos são as proteases (E.C. 3.4.), um tipo de enzima que catalisa a clivagem de proteínas e são encontradas em todos os organismos vivos. Das proteases vegetais, a bromelina do abacaxi (*Ananas comosus*) e a papaína do mamão (*Carica papaya*) são as mais utilizadas na indústria devido às suas propriedades químicas (WARD, 2011; CHAKRABORTY et al 2021).

O interesse em adotar medidas sustentáveis para o manejo de pragas é crescente devido ao impacto dos agrotóxicos químicos sintéticos no meio ambiente e na saúde humana. As proteases derivadas de plantas, além de estar implicadas em diversos processos fisiológicos (LIU et al., 2018), desempenham um papel importante na imunidade vegetal (MISAS-VILLAMIL; VAN DER HOORN; DOEHLEMANN, 2016) e têm sido investigadas para o controle de várias pragas de insetos herbívoros (KONNO et al., 2004; WIJANARKO., 2017; AFNAN., 2018). No entanto, sabe-se pouco sobre o seu efeito no controle de pragas de alimentos armazenados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do látex de mamão (*C. papaya*) e do extrato de abacaxi (*A. comosus*) sobre *Tenebrio molitor* L, conhecido como larva da farinha, que foi utilizado como inseto modelo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do extrato aquoso de abacaxi

O processo de extração foi realizado a partir de uma adaptação da metodologia de Domingues et al. (2013). Foram adquiridos frutos maduros de abacaxi do mercado local de Lavras, Minas Gerais, Brasil. A casca e a coroa de frutos foram retiradas para serem trituradas separadamente em liquidificador, utilizando-se água destilada na proporção de 1:1 (p/v) para a casca e 1:2 (p/v) para a coroa. Em seguida, as amostras foram filtradas manualmente com peneira, os resíduos sólidos foram descartados e o líquido foi centrifugado a 10.000 g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi congelado e então liofilizado durante 48 horas. O pó obtido foi armazenado a -20°C até seu uso nos experimentos. Para uso nos experimentos, o pó obtido da casca e da coroa do abacaxi foi diluído em água destilada nas concentrações descritas em cada experimento.

2.2 Coleta e processamento do látex de mamão

O látex foi coletado diretamente de frutos de mamão verde, de acordo com a metodologia de Chandrasekaran et al. (2018), com alterações. Com o auxílio de uma faca de aço inoxidável, foram feitas incisões longitudinais com profundidade de 3 mm na superfície dos frutos. Posteriormente, o látex foi congelado, liofilizado e armazenado a -20°C até ser utilizado nos experimentos. O pó obtido foi diluído em água destilada nas concentrações descritas em cada experimento. A papaína, uma das enzimas presentes no látex de mamão, foi obtida comercialmente (Dinâmica Química Contemporânea LTDA, Brasil) e, para uso nos experimentos, foi diluída em água destilada, nas concentrações descritas em cada experimento.

2.3 Mortalidade de larvas de *Tenebrio molitor*

Larvas de *T. molitor* adquiridas do Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Lavras foram selecionadas com pesos e tamanhos homogêneos (60 mg/larva com 2 cm de comprimento) e foram divididas em cinco grupos, representando cada tratamento, conforme Rankic et al. (2021). Cada grupo foi composto por 90 larvas divididas em três frascos com 30 larvas cada. Foi preparada uma solução de cada extrato diluído em água destilada a 15% (p/v). As larvas ficaram submersas por 5 s em 30 mL de cada extrato a cada 24 horas por 3 dias. As

larvas do grupo controle foram imersas apenas em água destilada. Após a imersão, o excesso de umidade das larvas foi removido em papel toalha. As larvas foram mantidas em uma sala a 25°C e 65% UR. Para determinar a porcentagem de mortalidade, o número de larvas mortas foi registrado a cada 24 horas durante 10 dias. As larvas que não responderam aos estímulos tácteis foram consideradas mortas. Usando o mesmo procedimento, um experimento adicional foi realizado com extratos fervidos. Os extratos foram fervidos no fogão durante 2 horas, após esse período, os extratos foram resfriados a temperatura ambiente e armazenados nas mesmas condições que os extratos ativos, até seu uso nos experimentos.

2.4 Mortalidade de pupas de *Tenebrio molitor*

Foi realizado o mesmo procedimento do experimento de imersão larval, com a diferença de que neste experimento foram utilizadas 30 pupas de *T. molitor* também adquiridas do Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Lavras. Pupas de 24 horas de vida e com pesos homogêneos (90 mg/pupas) foram selecionadas para o experimento. As pupas foram divididas em 3 frascos com 10 pupas cada. Da mesma forma, um experimento adicional foi realizado com extratos fervidos por duas horas como descrito anteriormente. Além do número de pupas mortas após a imersão nos extratos, foram registradas as mudanças corporais na metamorfose das pupas sobreviventes. A ausência ou mal formação das asas foi registrada e a porcentagem de deformação foi calculada.

2.5 Preparação de uma dieta artificial para larvas *Tenebrio molitor*

A dieta foi realizada de acordo com uma adaptação da metodologia utilizada por Lima et al. (2020). Utilizando farinha de trigo e água destilada, preparou-se uma solução nas concentrações de 100 mg/g, 250 mg/g e 500 mg/g para cada um dos extratos e agitou-se por 5 min. O grupo controle foi composto apenas por farinha de trigo. Subsequentemente, 2,5 mL da solução foram pipetados em placas de Petri (com peso conhecido) e deixados secar durante a noite à temperatura ambiente ($18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). No dia seguinte, as placas foram novamente pesadas e o peso da dieta contida em cada placa foi calculado. Em seguida, em cada placa de Petri, em triplicata, foram colocadas 15 larvas de *T. molitor* com pesos conhecidos (60 mg/larva com 2 cm de comprimento). O número de larvas mortas foi registrado semanalmente durante 28 dias.

2.6 Avaliação do índice de dissuasão alimentar (ID) e índices nutricionais em larvas de *T. molitor*

Seguindo a metodologia adaptada de Napoleão et al. (2013), utilizou-se os pesos da dieta e das larvas do dia 0 e dia 7. Em seguida, o índice de dissuasão alimentar (ID) foi calculado da seguinte forma: $ID (\%) = 100 \times (A - B) / (A)$, onde A é a massa de alimento ingerido por insetos no controle experimental e B é a massa de alimento ingerida pelos insetos na amostra de teste. Com base no ID, as amostras foram classificadas como promovidas: sem impedimento alimentar ($ID < 20\%$), dissuasão alimentar fraca ($20\% < ID < 50\%$), dissuasão alimentar moderada ($50\% < ID < 70\%$) ou forte dissuasão alimentar ($ID > 70\%$). Os mesmos dados foram usados para calcular os seguintes índices nutricionais: (a) taxa relativa de consumo = $C / (D \times \text{dias})$, onde C é a massa do alimento ingerido em mg e D corresponde à biomassa inicial dos insetos em mg; (b) taxa de ganho de biomassa relativa = $E / (D \times \text{dias})$, onde E corresponde à biomassa ganha em mg; e (c) a eficiência de conversão da alimentação ingerida = $E / (C \times 100)$.

2.7 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa estatístico Sisvar, por meio de análise de variância no nível de significância de 5%, seguida do teste de Tukey para detectar diferenças significativas e comparar os tratamentos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

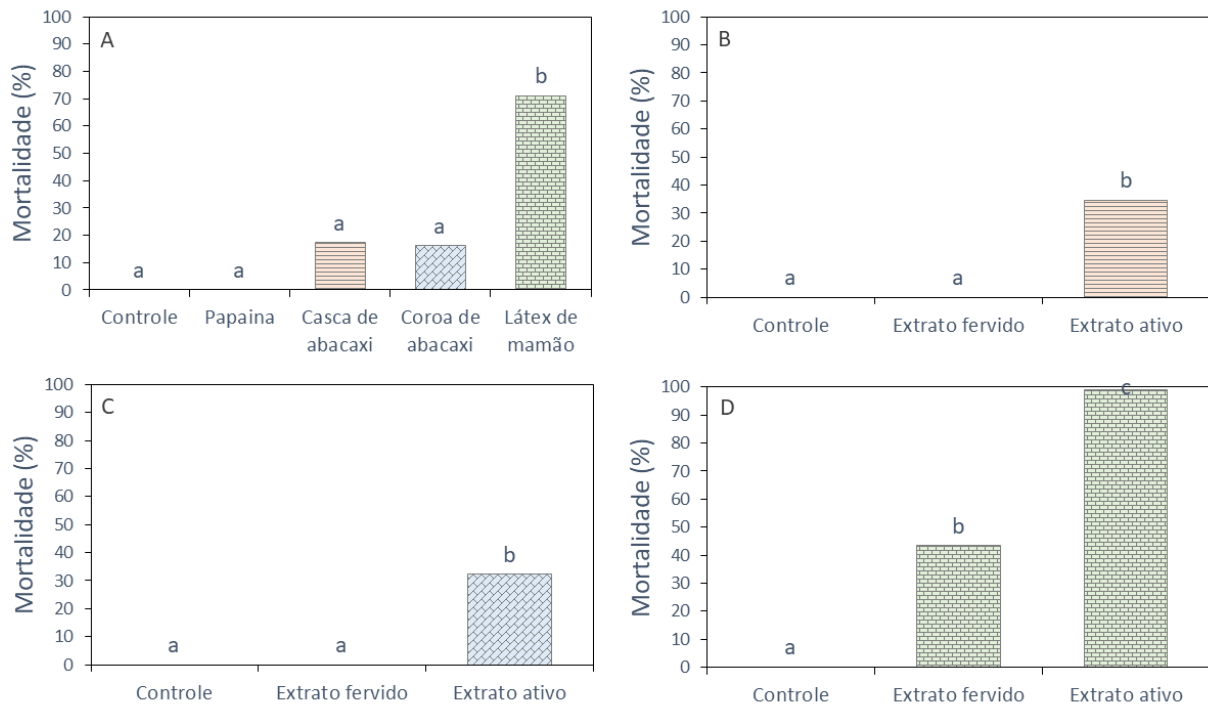
3.1 Mortalidade de larvas de *Tenebrio molitor*

O efeito das proteases presentes nos extratos da casca e coroa de abacaxi, látex de mamão e papaína, foi avaliado sobre larvas de *T. molitor* (Figura 5). Conforme mostrado na Figura 5A, o látex de mamão causou mortalidade maior ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle, com uma mortalidade média de 71,11%. Isso pode ser explicado porque o látex, além de proteases, contém outros tipos de enzimas, como quitinases, e substâncias tóxicas contra diversos tipos de pragas (RAMOS et al., 2019). O efeito proteolítico das proteases presentes nos extratos de casca de abacaxi (Figura 5B) e coroa de abacaxi (Figura 5C) sobre larvas de *T. molitor* foi confirmado quando comparado com extratos fervidos, com mortalidade causada pelo extrato ativo da casca de 34,45% e extrato ativo de coroa de abacaxi de 32,22%, ambos maiores ($P < 0,05$) do grupo controle e dos extratos fervidos.

A papaína pura não causou mortalidade nas larvas de *T. molitor*. No entanto, o látex ativo, apresentou maior ($P < 0,05$) mortalidade (98,89%), em comparação ao grupo com látex fervido, com mortalidade de 43,33%. Entretanto, o látex fervido ainda causou mortalidade maior ($P < 0,05$) que o grupo controle, sugerindo que a mortalidade causada no látex ativo (55,56%) maior que a mortalidade causada pelo extrato fervido), foi devido à ação de proteases (Figura 5D). O *T. molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae), comumente conhecido como larva da farinha, é um besouro amplamente utilizado como inseto modelo para diversos tipos de pesquisas, principalmente na área de produção de alimentos (LIU et al., 2020; SILVA et al., 2021; DJOUADI et al., 2022).

A cutícula do inseto representa parte do tegumento externo dos artrópodes, formado principalmente por polissacarídeos lineares e relativamente rígidos, quitina e proteínas estruturais (NOH et al., 2017). Serve tanto como pele quanto como esqueleto (exoesqueleto), determinando a forma do animal e também é a barreira que protege os insetos contra estresses ambientais e danos mecânicos (HACKMAN et al., 1984). O sucesso dos fungos entomopatogênicos utilizados no controle biológico de insetos se deve ao fato de penetrarem na cutícula por meio de pressão mecânica e degradação enzimática dos principais componentes da cutícula, ou seja, proteínas, quitina e lipídios (GOŁĘBIOWSKI et al., 2008).

Figura 5 - Efeito de diferentes fontes de proteases vegetais na mortalidade de larvas de *Tenebrio molitor*.



Legenda: A). Mortalidade média causada pelos diferentes extratos. A-B). Comparação da mortalidade causada pelos extratos ativo e fervidos da casca de abacaxi (B), coroa de abacaxi (C) e látex de mamão (D). As larvas de *T. molitor* ficaram submersas por 5 s em 30 mL de uma solução a 15% (p/v) de cada extrato, a cada 24 horas por 3 dias. As larvas do grupo controle foram imersas apenas em água destilada. Para determinar a porcentagem de mortalidade, o número de larvas mortas foi registrado a cada 24 horas durante 10 dias. As larvas que não responderam aos estímulos tácteis foram consideradas mortas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

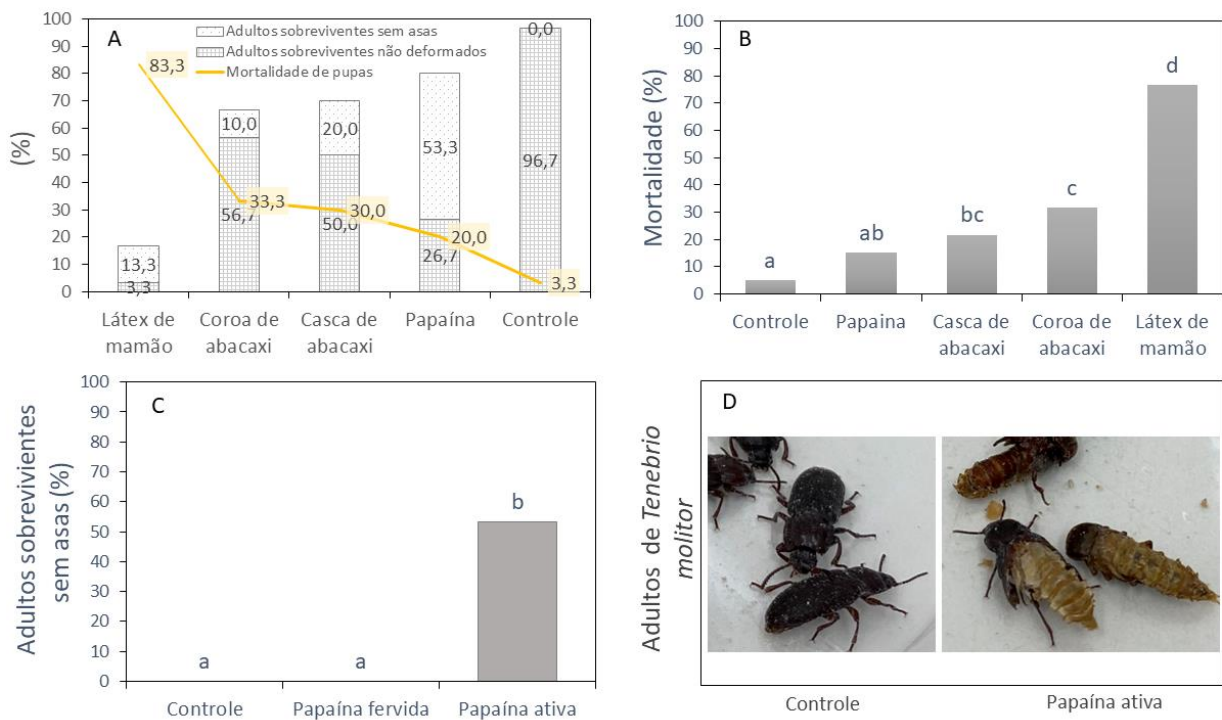
Fonte: Do Autor (2022).

3.2 Mortalidade de pupas de *Tenebrio molitor*

O efeito proteolítico dos extratos de abacaxi, látex de mamão e papaína também foi avaliado em pupas de *T. molitor* (Figura 6). A Figura 6A resume o efeito comparativo das diferentes fontes de proteases ativas na mortalidade e metamorfose das pupas. Em relação à mortalidade média, observou-se efeito ($P < 0,05$) nas pupas, causado pelo extrato de abacaxi, coroa de abacaxi e látex de mamão, pois foram estatisticamente diferentes do grupo controle (Figura 6B), com óbitos respectivos de 21,26 %, 31,67% e 76,67%. Em relação à papaína, a mortalidade média não foi diferente ($P < 0,05$) do grupo controle. No entanto, conforme mostrado na Figura 6C, a papaína ativa afetou o desenvolvimento das asas em adultos oriundos das pupas, em 53,33% das pupas inicialmente imersas na solução contendo papaína ativa. A ausência de asas causada pela papaína ativa, comparada ao desenvolvimento normal de asas no

grupo controle pode ser observada na Figura 6D, onde os adultos afetados pela papaína apresentaram ausência total ou parcial de asas. O mesmo efeito foi observado nas pupas sobreviventes ao tratamento com extrato ativo de coroa de abacaxi, látex e casca de abacaxi, respectivamente, em 10%, 13,3% e 20% das pupas inicialmente imersas na solução (Figura 6A). Não houve diferença ($P < 0,05$) entre as mortalidades causadas às pupas pelos extratos ativo e fervido para nenhum dos extratos avaliados.

Figura 6 - Efeito de diferentes fontes de proteases vegetais na mortalidade e metamorfose de pupas de *Tenebrio molitor*.



Legenda: A). Porcentagem de mortalidade de pupas de *T. molitor* em comparação com a porcentagem de pupas sobreviventes viradas em adultos, com ou sem deformações, e causada por diferentes fontes de proteases ativas. B). Mortalidade média causada por diferentes fontes de proteases ativas e fervidas. (C). Porcentagem de adultos sem asas que sobreviveram ao experimento de imersão de pupas, causado pela papaína ativa. D). Ausência de asas causada pela papaína ativa em adultos sobreviventes do experimento de imersão em pupas, em comparação com os adultos do grupo controle. Para o grupo controle usou-se apenas água destilada. As pupas ficaram submersas por 5 s em 30 mL de cada extrato a cada 24 horas por 3 dias. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Fonte: Do Autor (2022).

Dentre os danos cuticulares nas pupas, causados pelos extratos avaliados, destacam-se as queimaduras em tecidos não esclerotizados, como o tecido intersegmentar. Em relação a isso, existem dois tipos principais de cutículas nos insetos: as (1) cutículas flexíveis, caracterizadas por membranas intersegmentares e cutículas de muitas larvas moles, e as (2) cutículas sólidas e esclerotizadas que geralmente cobrem a maior parte da superfície corporal dos insetos. As

cutículas flexíveis tendem a ter um teor de água relativamente alto, contêm quantidades quase iguais de quitina e proteína, e as mesmas proteínas ou semelhantes são frequentemente depositadas antes e depois da ecdise. As cutículas sólidas e esclerotizadas contêm pouca água, as quantidades de proteína tendem a ser várias vezes maiores do que a quantidade de quitina, e a composição proteica da parte pré-ecdisial da cutícula é marcadamente diferente daquela da parte pós-ecdisial da cutícula (ANDERSEN et al., 2002).

3.3 Índice de dissuasão alimentar (ID) e parâmetros nutricionais em larvas de *T. molitor*

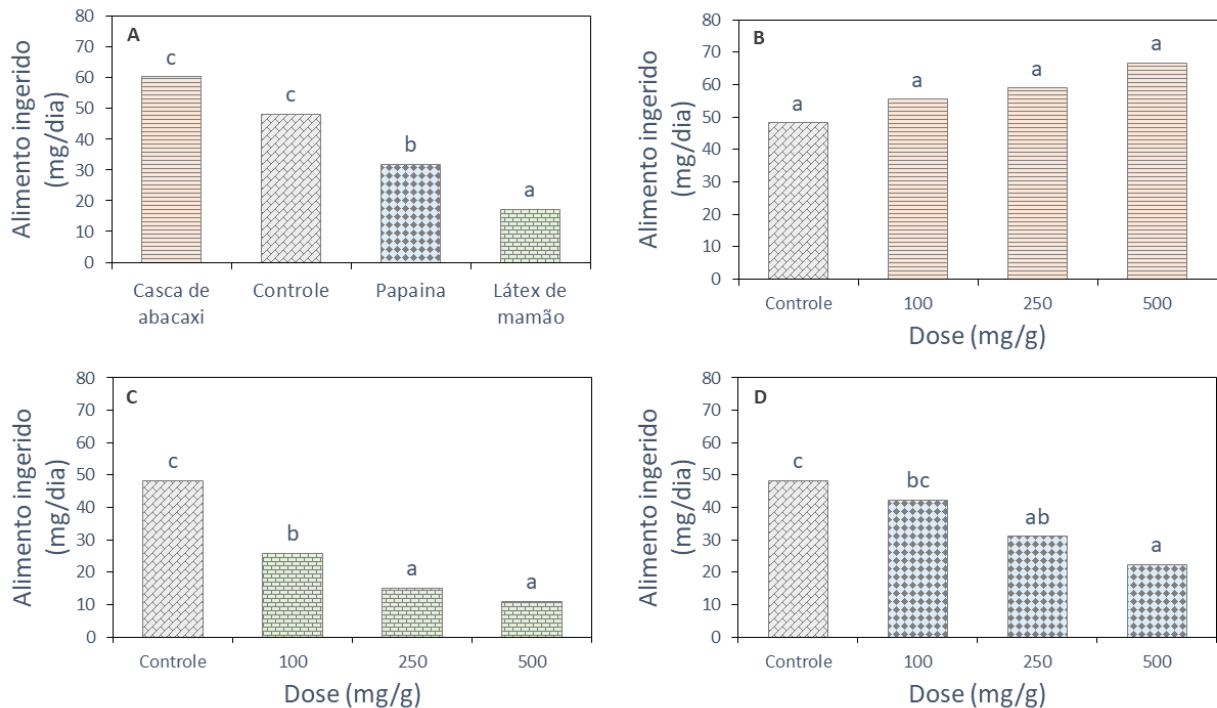
Além dos experimentos de imersão, foi realizado um experimento de ingestão, no qual preparou-se uma dieta artificial de farinha de trigo para cada um dos extratos (casca de abacaxi, látex de mamão e papaína), a fim de avaliar a mortalidade larval e o comportamento alimentar por meio do índice de dissuasão alimentar (ID%), e parâmetros nutricionais como taxa de consumo relativo, taxa de ganho de peso relativo e eficiência de conversão alimentar. A toxicidade avaliada com os diferentes extratos presentes na dieta à base de farinha de trigo não causou mortalidade nas larvas de *T. molitor*. No entanto, o comportamento alimentar foi afetado.

A quantidade média de alimento ingerido pelas larvas de *T. molitor* (Figura 7), foi de 48,19 mg/dia para o grupo controle (apenas farinha de trigo), sendo igual ($p < 0,05$) ao consumo da dieta contendo extrato de casca de abacaxi (60,32 mg/dia). As larvas reduziram a quantidade de alimento ingerido quando a papaína estava presente na dieta, com ingestão média de 31,86 mg/dia, sendo diferente ($p < 0,05$) do grupo controle. O mesmo comportamento foi observado no consumo de alimentos contendo látex de mamão, com ingestão média de 17,27 mg/dia, sendo diferente ($p < 0,05$) de todos os grupos (Figura 7A).

O aumento da ingestão de alimentos pelas larvas na dieta contendo extrato de casca de abacaxi provavelmente está relacionado ao alto teor de açúcar. No entanto, esse aumento não foi diferente do grupo controle ($p < 0,05$), mesmo quando a dose de extrato de casca de abacaxi de 500 mg/g aumentou 18,38 mg/dia de alimento consumido pelas larvas, em relação ao grupo controle (Figura 7B). Ao contrário do observado com o extrato de casca de abacaxi, o látex e a papaína causaram redução no consumo de ração à medida que a dose de extrato foi aumentada. A dose de 500 mg/g de látex reduziu 37,24 mg/dia, em relação ao controle (Figura 7C). Da mesma forma, com exceção de 100 mg/g de papaína, que foi igual ($P < 0,05$) ao controle, a presença de 500 mg/g de papaína na dieta reduziu em 25,81 mg/dia a ingestão de alimento pelas larvas, em relação ao controle (Figura 7D).

Conforme relatado anteriormente, extratos vegetais oferecidos em uma dieta artificial com farinha de trigo apresenta toxicidade sobre pragas de alimentos armazenados, (LIU; GOH; HO, 2007; NAPOLEÃO et al., 2013; LIMA et al., 2020; DE OLIVEIRA., 2020). No entanto, esses estudos foram realizados em insetos adultos, e em nosso experimento foram utilizadas larvas, pois em testes preliminares foi observado canibalismo entre adultos de *T. molitor*.

Figura 7 - Alimento ingerido (mg/dia) por larvas de *Tenebrio molitor*, oferecido em uma dieta artificial composta por farinha de trigo (controle) misturada com extratos ativos.



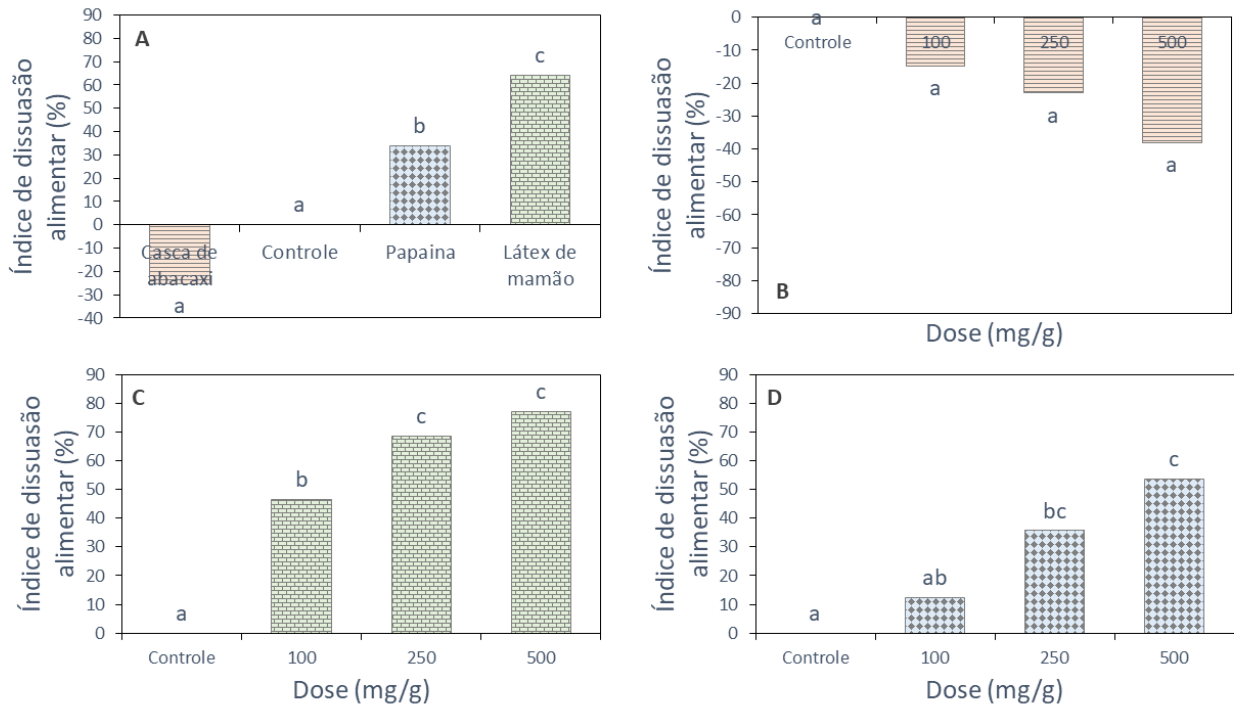
Legenda: A). Efeito de diferentes fontes de proteases ativas na ingestão da dieta artificial pelas larvas. B-C) Efeito de diferentes doses (100 mg/g, 250 mg/g e 500 mg/g) de proteases ativas de casca de abacaxi (B), látex de mamão (C) e papaína (D), na quantidade de alimento ingerido pelas larvas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Fonte: Do Autor (2022).

O comportamento das larvas em termos de ingestão de alimentos é refletido em valores de índice de dissuasão ou repelência alimentar (Figura 8). Em média, tanto a papaína quanto o látex de mamão causaram um índice de dissuasão alimentar de 33,80% e 64,09%, ambos diferentes ($P < 0,05$) do grupo controle. O índice de dissuasão alimentar médio causado pelo extrato de casca de abacaxi foi de -25,27%, indicando um aumento no consumo de alimento pelas larvas, apesar de não ser diferente ($P < 0,05$) do grupo controle. Esse comportamento é observado na Figura 8B, pois à medida que a dose de extrato de casca de abacaxi é aumentada, o indicador de dissuasão é reduzido. O látex de mamão apresentou índice de dissuasão alimentar de 46,62%, 68,48% e 77,16% para as doses de 100 mg/g, 250 mg/g e 500 mg/g,

respectivamente, todas estatisticamente ($P < 0,05$) diferentes do grupo controle (Figura 8C). A papaína causou significativa dissuasão alimentar ($P < 0,05$) em relação ao controle, apenas nas doses de 250 mg/g e 500 mg/g, com índices de 35,71% e 53,62%, respectivamente (Figura 8D).

Figura 8 - Índice de dissuasão alimentar (%) em larvas de *Tenebrio molitor* após ingestão de uma dieta artificial de farinha de trigo (controle) misturada com diferentes fontes de proteases ativas.



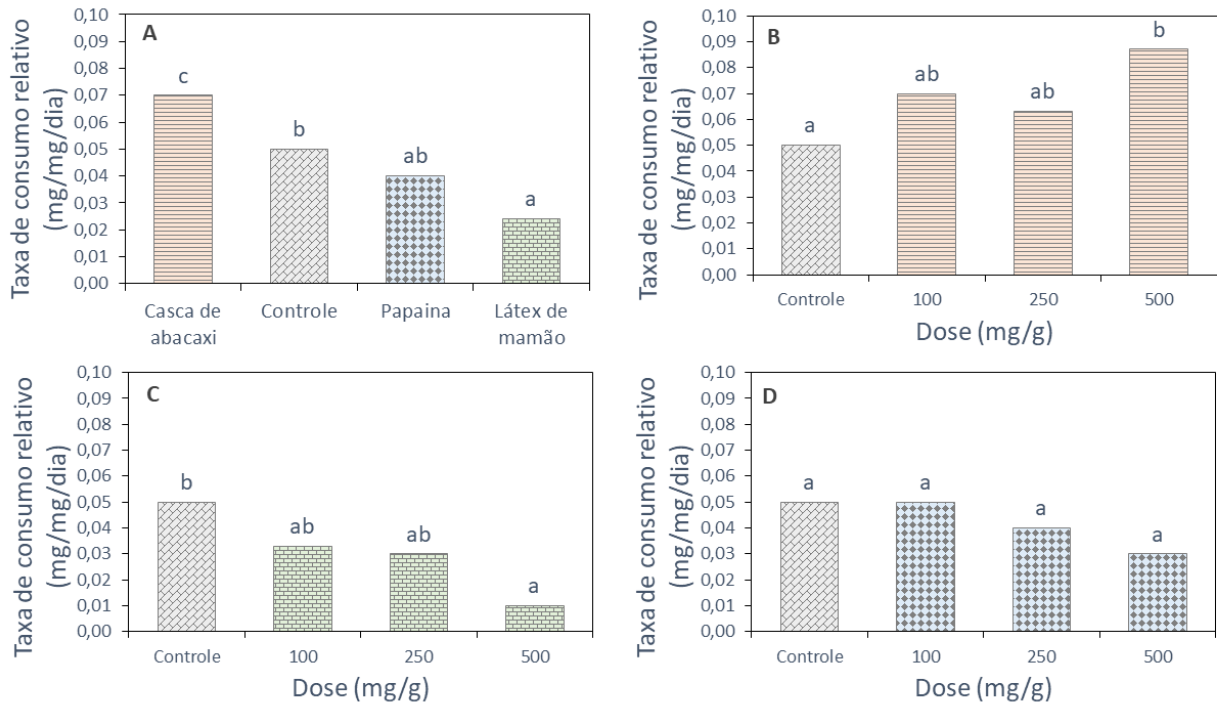
Legenda: A) Efeito de diferentes fontes de proteases ativas presentes na dieta artificial no índice de dissuasão alimentar. B-C). Efeito de diferentes doses (100 mg/g, 250 mg/g e 500 mg/g) de proteases ativas presentes na dieta artificial composta por farinha de trigo misturada com casca de abacaxi (B), látex de mamão (C) e papaína (D), no índice de dissuasão alimentar das larvas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Fonte: Do Autor (2022).

A taxa de consumo relativo das larvas (Figura 9) foi reduzida apenas pela presença de látex de mamão na dieta (Figura 9A). Quando 500 mg/g de mamão estavam presentes na dieta, as larvas consumiram 0,01 mg de alimento por mg de peso corporal por dia, sendo estatisticamente diferente ($P < 0,05$) do grupo controle (Figura 9C). Em contrapartida, o extrato de casca de abacaxi fez com que as larvas consumissem 0,07 mg de alimento por mg de peso corporal por dia, sendo estatisticamente ($P < 0,05$) maior que o grupo controle, com consumo de 0,05 mg/mg/dia, e esse aumento no consumo foi estimulado por doses de 500 mg/g (Figura 9B). A papaína não interferiu na taxa de consumo relativo das larvas (Figura 9D), sugerindo

que a perda de peso dos insetos não foi significativa, em relação à quantidade de alimento ingerido, em relação ao grupo controle.

Figura 9 - Taxa de consumo relativo em larvas de *Tenebrio molitor* após ingestão de uma dieta artificial de farinha de trigo (controle) misturada com diferentes fontes de proteases ativas.

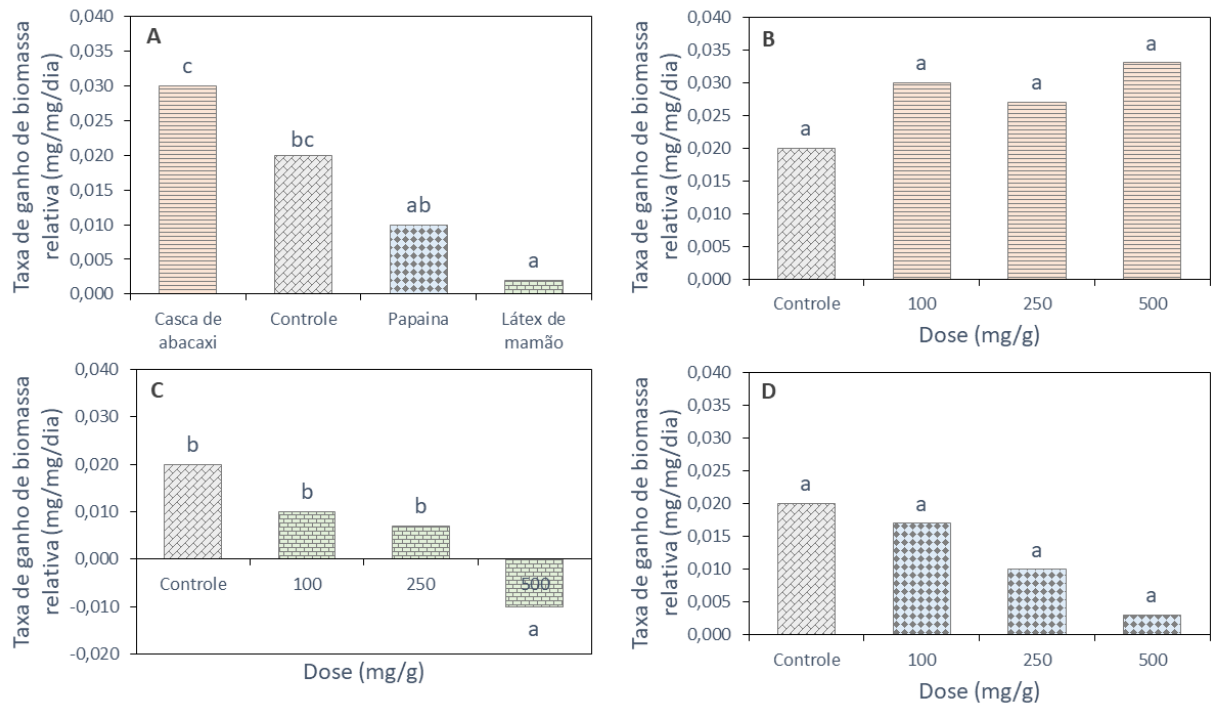


Legenda: A) Efeito de diferentes fontes de proteases ativas presentes na dieta artificial sobre a taxa relativa de consumo das larvas. B-C). Efeito de diferentes doses (100 mg/g, 250 mg/g e 500 mg/g) de proteases ativas presentes na dieta artificial composta por farinha de trigo misturada com casca de abacaxi (B), látex de mamão (C) e papaína (D), na taxa de consumo relativo das larvas. Este parâmetro nutricional indica a quantidade de alimento consumido em mg por mg de peso corporal dos insetos a cada dia. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Fonte: Do Autor (2022).

A taxa de ganho de biomassa relativa (Figura 10) foi afetada apenas significativamente ($P < 0,05$) pela presença de 500 mg/g de látex de mamão na dieta, em comparação ao grupo controle (Figura 10C). Indicando perda de peso significativa provavelmente causada pela forte dissuasão alimentar (77,16%) observada para essa mesma dose de látex de mamão. Em relação aos diferentes tipos de extratos (Figura 10A), a taxa de ganho relativo de biomassa causada pela casca de abacaxi foi estatisticamente ($P < 0,05$) a mesma do grupo controle, mas diferente da papaína e do látex de mamão. Indicando que o extrato de abacaxi favoreceu o crescimento das larvas, provavelmente devido ao alto teor de açúcar e carboidratos, comparado ao látex e papaína.

Figura 10 - Taxa de ganho de biomassa relativa em larvas de *Tenebrio molitor* após ingestão de uma dieta artificial de farinha de trigo (controle) misturada com diferentes fontes de proteases ativas.

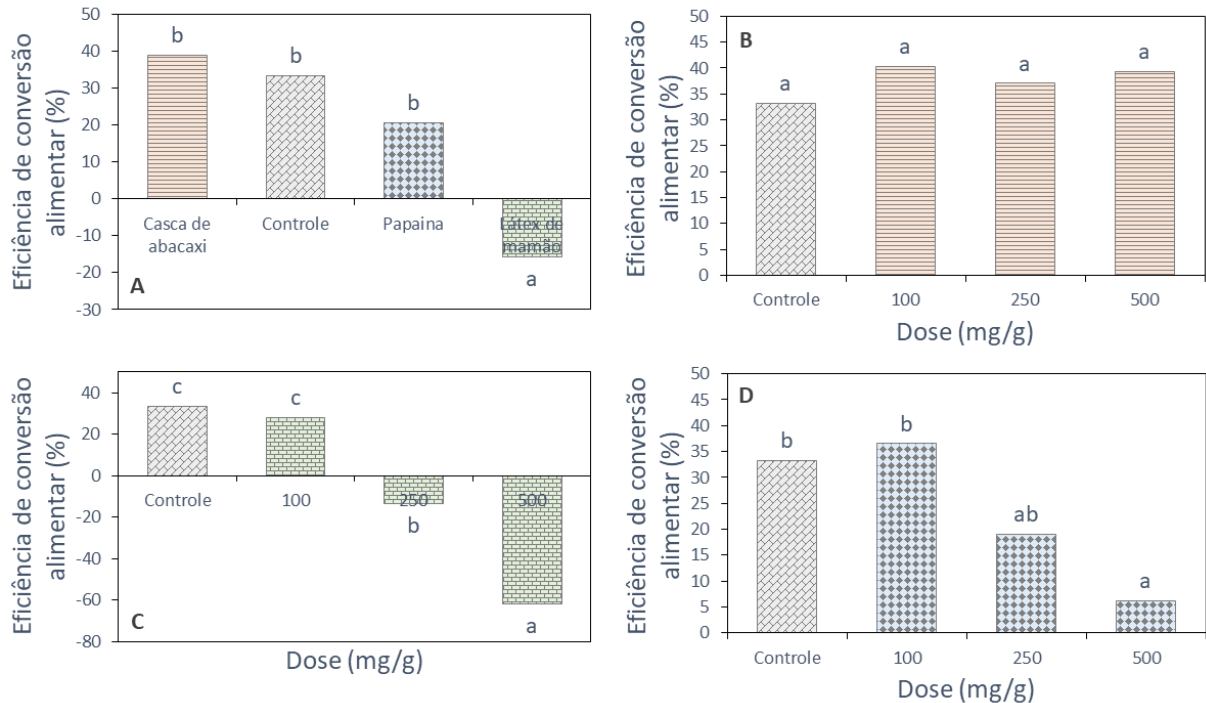


Legenda: A) Efeito de diferentes fontes de proteases ativas presentes na dieta artificial sobre a taxa de ganho de biomassa relativo das larvas. B-C). Efeito de diferentes doses (100 mg/g, 250 mg/g e 500 mg/g) de proteases ativas presentes na dieta artificial composta por farinha de trigo misturada com casca de abacaxi (B), látex de mamão (C) e papaína (D), na taxa de ganho de biomassa relativo das larvas. Este parâmetro nutricional indica a quantidade de biomassa ganha a cada dia por mg de peso corporal inicial. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Fonte: Do Autor (2022).

A quantidade de alimento ingerido incorporado pelos insetos como biomassa (conversão alimentar, Figura 11), comparado aos diferentes tipos de extratos avaliados (Figura 11A), foi afetado apenas pelo látex de mamão com redução média de -15,71%, estatisticamente diferente ($p < 0,05$) do grupo controle e dos demais extratos. Em relação às diferentes doses avaliadas, foi observada diferença significativa apenas para a dose de 500 mg/g de látex de mamão, com redução de -61,78% (95,04% menor que o grupo controle, Figura 11C), e 500 mg/g de papaína, com redução na conversão alimentar de 6,13% (27,14% menos que o grupo controle, Figura 11D)

Figura 11 - Eficiência da conversão do alimento ingerido (%) por larvas de *Tenebrio molitor* após ingestão de uma dieta artificial de farinha de trigo (controle) misturada com diferentes fontes de proteases ativas.



Legenda: A) Efeito de diferentes fontes de proteases ativas presentes na dieta artificial sobre a eficiência da conversão do alimento. B-C). Efeito de diferentes doses (100 mg/g, 250 mg/g e 500 mg/g) de proteases ativas presentes na dieta artificial composta por farinha de trigo misturada com casca de abacaxi (B), látex de mamão (C) e papaína, na eficiência da conversão do alimento ingerido. Este parâmetro nutricional indica a quantidade de alimento ingerido incorporado pelos insetos como biomassa. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Fonte: Do Autor (2022).

A papaína pura não teve efeito sobre a mortalidade larval, provavelmente porque a cutícula esclerotizada é formada por, além de proteínas, outros compostos como lipídios e quitina, conferindo rusticidade e proteção contra fatores adversos (HACKMAN et al., 1984; GOŁĘBIEWSKI et al., 2008 NOH et al., 2017). No entanto, o dano no tecido relacionado ao desenvolvimento das asas dos *T. molitor* foi afetado pela papaína, provavelmente porque nessa fase de crescimento esse tecido específico ainda não está bem desenvolvido, ou o conteúdo de substâncias que conferem resistência é reduzido. A casca do abacaxi presente na dieta estimulou a alimentação das larvas, sem causar nenhum efeito tóxico, provavelmente devido ao alto teor de açúcar e baixo teor de enzimas. Mais estudos são necessários para identificar e caracterizar o tecido que é afetado durante o desenvolvimento da asa em *T. molitor*, causado pela papaína.

4 CONCLUSÃO

O látex de mamão e os extratos de casca e coroa de abacaxi causaram atividade tóxica contra larvas e pupas de *Tenebrio molitor*, em particular os compostos presentes no látex de mamão que afetaram fortemente a mortalidade tanto de larvas quanto de pupas, além de dissuadir a alimentação das larvas. A papaína ativa não teve efeito sobre a mortalidade das larvas de *T. molitor*.

5 REFERÊNCIAS

- AFNAN, N. T. et al. Producing armyworm (*spodoptera sp.*) bioinsecticide based on cysteine protease of red ginger (*zingiber officinale* var. Rubrum). In: **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. IOP Publishing, 2018. p. 012062. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/316/1/012062>
- AGRAWAL, Anurag A.; KONNO, Kotaro. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 40, p. 311-331, 2009. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120307>
- ANDERSEN, S. O. Characteristic properties of proteins from pre-ecdysial cuticle of larvae and pupae of the mealworm *Tenebrio molitor*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 9, p. 1077-1087, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00045-0](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00045-0)
- CHAKRABORTY, Arka Jyoti et al. Bromelain a potential bioactive compound: a comprehensive overview from a pharmacological perspective. **Life**, v. 11, n. 4, p. 317, 2021. <https://doi.org/10.3390/life11040317>
- CHANDRASEKARAN, Rajkuberan et al. *Carica papaya* (Papaya) latex: a new paradigm to combat against dengue and filariasis vectors *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **3 Biotech**, v. 8, n. 2, p. 1-10, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1105-6>
- DE OLIVEIRA, Ana Patrícia Silva et al. Evaluation of the insecticidal activity of *Moringa oleifera* seed extract and lectin (WSMoL) against *Sitophilus zeamais*. **Journal of stored products research**, v. 87, p. 101615, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2020.101615>
- DJOUADI, Anna et al. Development of Healthy Protein-Rich Crackers Using *Tenebrio molitor* Flour. **Foods**, v. 11, n. 5, p. 702, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11050702>
- DOMINGUES, Luciana Ferreira et al. In vitro activity of pineapple extracts (*Ananas comosus*, Bromeliaceae) on *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental parasitology**, v. 134, n. 3, p. 400-404, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.021>
- GOŁĘBIEWSKI, Marek et al. The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 6, p. 619-627, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.03.005>
- GOMES, E. H. et al. Role of *Synadenium grantii* latex proteases in nematocidal activity on *Meloidogyne incognita* and *Panagrellus redivivus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, p. 665-668, 2018. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.188129>
- HACKMAN, R. H. Cuticle: biochemistry. In: **Biology of the Integument**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1984. p. 583-610. https://doi.org/10.1007/978-3-642-51593-4_30

KONNO, Kotaro et al. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **The Plant Journal**, v. 37, n. 3, p. 370-378, 2004. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01968.x>

KONNO, Kotaro. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1510-1530, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.016>

LIMA, Janaína Kívia Alves et al. Biototoxicity of aqueous extract of *Genipa americana* L. bark on red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst). **Industrial Crops and Products**, v. 156, p. 112874, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112874>

LIU, Changqi et al. Growth performance and nutrient composition of mealworms (*Tenebrio molitor*) fed on fresh plant materials-supplemented diets. **Foods**, v. 9, n. 2, p. 151, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9020151>

LIU, Huijuan et al. Role of papain-like cysteine proteases in plant development. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1717, 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01717>

LIU, Zhi Long; GOH, Swee Hock; HO, Shuit Hung. Screening of Chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, v. 43, n. 3, p. 290-296, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2006.06.010>

MARINCHENKO, Tatiana. Entomophages as a Perspective Direction of Plant Protection. **KnE Life Sciences**, p. 374–383-374–383, 2021. <https://doi.org/10.18502/cls.v0i0.8968>

MISAS-VILLAMIL, Johana C.; VAN DER HOORN, Renier AL; DOEHLEMANN, Gunther. Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity. **New Phytologist**, v. 212, n. 4, p. 902-907, 2016. <https://doi.org/10.1111/nph.14117>

NAPOLEÃO, Thiago Henrique et al. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of stored products research**, v. 54, p. 26-33, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2013.04.002>

NOH, Mi Young et al. Development and ultrastructure of the rigid dorsal and flexible ventral cuticles of the elytron of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 91, p. 21-33, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.11.003>

OGUNNUPEBI, Temitope A. et al. Promising Natural Products in Crop Protection and Food Preservation: Basis, Advances, and Future Prospects. **International Journal of Agronomy**, v. 2020, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8840046>

PEACHEY, L. E. et al. Papaya latex supernatant has a potent effect on the free-living stages of equid cyathostomins in vitro. **Veterinary parasitology**, v. 228, p. 23-29, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.036>

RAMOS, Márcio Viana et al. Laticifers, latex, and their role in plant defense. **Trends in plant science**, v. 24, n. 6, p. 553-567, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.03.006>

RANKIC, Ivan et al. Nano/microparticles in conjunction with microalgae extract as novel insecticides against Mealworm beetles, *Tenebrio molitor*. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2021.

SILVA, Luciana Barboza et al. Development of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) on poultry litter-based diets: Effect on chemical composition of larvae. **Journal of Insect Science**, v. 21, n. 1, p. 7, 2021. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieaa145>

SUTEU, Daniela et al. Challenge of utilization vegetal extracts as natural plant protection products. **Applied Sciences**, v. 10, n. 24, p. 8913, 2020. <https://doi.org/10.3390/app10248913>

WAR, Abdul Rashid et al. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant signaling & behavior**, v. 7, n. 10, p. 1306-1320, 2012.

WARD, O. P. Proteases. **Comprehensive biotechnology**, p. 571, 2011. Doi: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00222-1

WIJANARKO, Anondho et al. Production of a biopesticide based on a cysteine protease enzyme from latex and papaya (*Carica papaya*) for *Spodoptera litura* in red chili peppers (*Capsicum annuum*). **International Journal of Technology**, v. 8, n. 8, p. 1455-1461, 2017. <https://doi.org/10.14716/ijtech.v8i8.788>

YACTAYO-CHANG, Jessica P. et al. Plant defense chemicals against insect pests. **Agronomy**, v. 10, n. 8, p. 1156, 2020. <https://doi.org/10.3390/agronomy10081156>

YADAV, Ishwar Chandra et al. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. **Science of the Total Environment**, v. 511, p. 123-137, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.041>

ZARBIN, Paulo HG; RODRIGUES, Mauro ACM; LIMA, Eraldo R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, p. 722-731, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300016>

ARTIGO 3 - Proteases de cisteína vegetal como alternativa sustentável contra pragas agrícolas e parasitas de animais³

³Elaborado de acordo com o periódico Bulletin of the National Research Centre

Proteases de cisteína vegetal como alternativa sustentável contra pragas agrícolas e parasitas de animais

Henry Leonel Bueso Castro¹, Filipe Elias de Freitas Soares^{2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal – Universidade Federal de Lavras (UFLA) Caixa Postal 3037 – 37200-900 – Lavras, MG – Brazil

²Departamento de Química – Universidade Federal de Lavras (UFLA) Caixa Postal 3037 – 37200-900 – Lavras, MG – Brazil

* **Correspondência:** ¹henrybueso1993@gmail.com, ²filippe.soares@ufla.br

RESUMO

As perdas causadas por insetos-praga, fitopatógenos e parasitas de animais representam uma das maiores ameaças à segurança alimentar. O atual controle de pragas é baseado principalmente em pesticidas e drogas sintéticas; no entanto, são questionados devido aos seus efeitos nocivos e à perda de eficácia contra pragas resistentes. As cisteína proteases (CPs), presentes em alguns frutos e no látex de plantas como abacaxi, mamão, kiwi e figo, possuem diversas aplicações industriais devido às suas propriedades bioquímicas, porém, têm sido relatadas como um produto promissor para o controle de insetos-praga, nematoides de plantas, ectoparasitas animais e parasitas gastrointestinais. Aqui mostramos evidências relatadas em alguns estudos sobre o potencial dos CPs para o desenvolvimento de alternativas sustentáveis para o controle de pragas agrícolas e parasitas de animais.

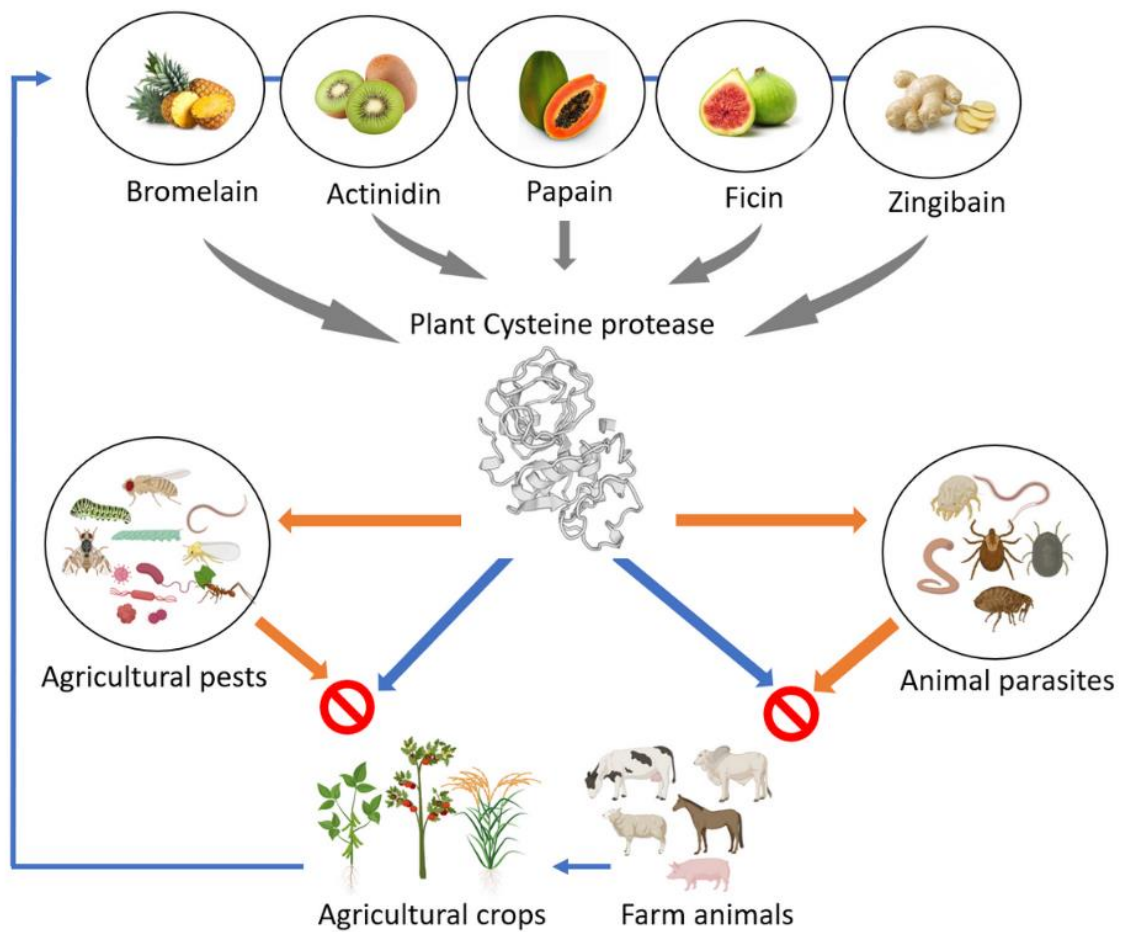
Palavras-chave: Cisteína protease, Insetos-praga, Ectoparasitas, Parasitas gastrointestinais

Texto do resumo gráfico

Os produtos químicos sintéticos contra pragas e parasitas, além de perderem eficácia contra pragas resistentes, são questionados, pois geram resíduos prejudiciais ao meio ambiente e a organismos não-alvo. As cisteína proteases vegetais (CPs) presentes em frutas como mamão, abacaxi, kiwi e figo, representam uma alternativa sustentável para o manejo de diversos tipos de pragas agrícolas (insetos herbívoros e patógenos) e parasitas de animais (ecto e endoparasitas).

Imagem do resumo gráfico

Figura 12 - Resumo gráfico do artigo



Fonte: Do Autor (2022). Figuras adaptadas de google imagem e <https://biorender.com/>

1. INTRODUÇÃO

Dentre os diversos fatores que afetam a agricultura e a pecuária, as perdas causadas por artrópodes pragas, patógenos fitoparasitas e parasitas animais representam uma das maiores ameaças. No caso das culturas agrícolas, estima-se que entre 20 e 40% de todas as perdas da produtividade global seja causada por pragas e patógenos fitoparasitas (Finegold et al., 2019). Os artrópodes destroem cerca de 18 a 26 % da produção agrícola anual em todo o mundo, no valor de mais de US\$ 470 bilhões (Culliney, 2014). Anualmente, a invasão de insetos-praga custa à economia mundial cerca de US\$ 70 bilhões, as doenças das plantas custa US\$ 220 bilhões aproximadamente (Marinchenko, 2021) e nematoides parasitas de plantas causam perdas aproximadas de US\$ 157 bilhões (Sikandar et al., 2020).

Em relação à pecuária, um dos principais subsetores da agricultura, tem mostrado um crescimento elevado devido ao aumento da demanda global de carne e leite (Abubakar et al., 2020). No entanto, as infecções causadas por endoparasitas (como nematoides e protozoários) e ectoparasitas (como pulgas, ácaros, carrapatos, piolhos e moscas), representam um dos principais problemas que comprometem a produção e bem-estar animal. No tocante ao controle destes parasitas, este baseia-se principalmente no uso de antiparasitários químicos sintéticos que, além de nem sempre demonstrarem total eficácia, causam poluição ambiental, e parasitas de muitas espécies como ovinos, caprinos, bovinos e equinos estão desenvolvendo resistência a essas drogas (de León et al., 2020; Selzer and Epe, 2021).

Para o controle de pragas das culturas agrícolas, estão disponíveis diversas estratégias. No entanto, o uso de pesticidas sintéticos é uma das mais utilizadas (Kumar and Singh, 2014). Os pesticidas sintéticos são eficazes na proteção das culturas agrícolas. Porém, muitas pragas têm adquirido resistência ao efeito desses produtos. Além do mais, o uso contínuo e indiscriminado tem causado preocupação uma vez que gera impactos negativos ao meio ambiente (Özkara et al., 2016; Bilal et al., 2019; Rousis et al., 2021), já que polui o solo (Pérez-Lucas et al., 2019), o ar (de Souza Guida et al., 2018), e a água (Deknock et al., 2019). Além disso, alguns estudos têm reportado que os pesticidas químicos sintéticos têm efeitos tóxicos sobre humanos, plantas, animais, polinizadores e organismos benéficos (Sabarwal et al., 2018; Hashimi et al., 2020). Embora as consequências sejam conhecidas, nas últimas décadas houve um crescimento no uso de agrotóxicos em todo o mundo, e precisa-se adotar métodos alternativos e mais seguros a fim de proteger o meio ambiente, os animais e a saúde humana (Liu et al., 2015; Carvalho, 2017).

O uso de defensivos naturais conhecidos como biopesticidas tem ganhado importância para o controle de pragas já que são menos tóxicos para o homem e organismos não alvos, são facilmente biodegradáveis e sem liberação de resíduos prejudiciais para o ambiente (Campos et al., 2019; Mfarrejet al., 2019; Lengai et al., 2020; Suteu et al., 2020; Ogunnupebi et al., 2020). Dentre os compostos naturais, os extratos vegetais contêm substâncias como metabólitos secundários e diversas enzimas, como as cisteíno proteases (EC 3.4.22) que catalisam a clivagem de ligações peptídicas, e representam um dos quatro principais grupos de hidrolases (Grzonka et al., 2007; Buttle, 2013).

As cisteíno proteases (CPs) mediam uma grande variedade de processos fisiológicos e patológicos, e estão presentes em todos os organismos vivos. Nas plantas, cumprem funções fisiológicas fortemente reguladas como germinação de sementes e papéis de defesa, e são comumente encontradas em frutas de plantas como *Carica papaya*, *Ananas comosus*, *Ficus carica* e *Actinidia deliciosa*; e no látex de diferentes famílias de plantas (Domsalla and Melzig, 2008; Martínez et al., 2012; Sun et al., 2016).

A maioria das proteases comerciais são produzidas a partir de fontes microbianas e animais. As CPs vegetais, com base em suas diversas aplicações, são de grande interesse para as indústrias alimentícia, têxtil, médica e farmacêutica, devido a suas propriedades e atividade em uma ampla faixa de pH e temperatura, além de grande estabilidade e especificidade de substrato. Contudo, pesquisas têm demonstrado que as CPs vegetais são promissoras para o desenvolvimento de métodos alternativos para o controle de pragas, patógenos e parasitas, já que foi observado eficácia para controlar nematoides (Gomes et al., 2019; Sufiate et al., 2021), insetos (Wijanarko et al, 2017; Afnan et al., 2018; Batool et al., 2021), carrapatos (Juasook et al., 2018; Filgueiras et al., 2021), fungos (López-García et al., 2012), bactérias (Ávalos-Flores et al., 2021) e parasitas gastrointestinais (Njom et al., 2021; Mansur et al., 2021). Nesse contexto, este trabalho tem como objetivo revisar as evidências científicas desenvolvidas sobre as CPs de origem vegetal (frutas/látex) como alternativas sustentáveis contra pragas agrícolas e parasitas de animais

2. CONSEQUÊNCIAS DO USO DE PESTICIDAS SINTÉTICOS.

Os pesticidas têm desempenhado um papel fundamental na agricultura e pecuária depois da década 50 (Kumar and Singh, 2014, Karasali and Maragou, 2016). Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization), pesticidas são substâncias ou misturas de substâncias destinadas a controlar, prevenir, destruir, repelir ou atrair qualquer organismo biológico considerado uma praga. Assim, uma praga é definida como qualquer espécie vegetal ou animal, raça ou biótipo ou agente patogênico prejudicial às plantas ou produtos vegetais. Os pesticidas podem ser classificados em diferentes categorias de acordo com o organismo praga que matam (inseticidas, nematocidas, acaricidas, fungicidas, rodenticidas, moluscicidas, algicidas, herbicidas), o tipo de formulação (líquido, pós, grânulos, iscas, líquido de ultra baixo volume), a fonte de origem (natural ou sintética), o modo de ação/entrada (repelentes, fumigantes, pré/pós emergente, sistêmico e não sistêmico) e a toxicidade (praticamente não tóxico, ligeiramente tóxico, moderadamente tóxico e altamente tóxico). De acordo com os grupos funcionais, os pesticidas foram classificados como organofosforados, carbamatos, triazinas e fenoxis (Bilal et al., 2019).

Os pesticidas oferecem vários benefícios para a agricultura, pois fornecem proteção às culturas por meio do controle de várias espécies de pragas, o que melhorou a capacidade produtiva das lavouras (Carvalho, 2017). No entanto, causam impactos negativos ao meio ambiente, organismos não-alvo e saúde humana. Por exemplo, Rousis et al. (2021) coletou e analisou amostras diárias de águas residuais em Atenas, Grécia, entre 2014 e 2020, para 756 pesticidas, seus produtos de transformação ambiental e seus metabólitos humanos. Quarenta pesticidas foram quantificados em concentrações médias de até 4,9 µg/L. A classe mais abundante foram os fungicidas, seguida dos herbicidas, repelentes de insetos, inseticidas e reguladores de crescimento de plantas. A análise de águas residuais revelou a presença de pesticidas não aprovados na Europa.

Uma vez presentes no meio ambiente (Pérez-Lucas et al., 2019), pessoas e animais podem entrar em contato com produtos químicos tóxicos através da água (Deknock et al., 2019), do ar (de Souza Guida et al., 2018) e de produtos agrícolas (Carvalho, 2017). A intoxicação por pesticidas químicos sintéticos é um problema de saúde pública global e é responsável por cerca de 300.000 mortes em todo o mundo a cada ano (Sabarwal et al., 2018). Esses resíduos tóxicos podem ser armazenados nos tecidos humanos e animais, afetando o cérebro, rins, pele, sistema digestivo, fígado, pulmões, baço e todos os órgãos humanos, causando diversas doenças como cânceres e mutações. Além disso, esses produtos químicos destroem as colônias de abelhas,

diminuem as populações de polinizadores e podem suprimir organismos do solo, pássaros e animais selvagens (Hashimi et al., 2020; Rani et al., 2021). Para reduzir a poluição ambiental causada por pesticidas químicos sintéticos, alternativas sustentáveis devem ser adotadas, como o uso de produtos com baixa toxicidade, alta seletividade, alta especificidade e rápida biodegradabilidade.

3. INCONVENIENTES DO USO DE ANTIPARASITÁRIOS SINTÉTICOS.

Fármacos como os antiparasitários químicos têm sido utilizados com sucesso tanto no controle de endo como de ectoparasitas de animais. Atualmente, os endoparasiticidas utilizados incluem benzimidazóis, imidazotiazóis, tetrahidropirimidinas e lactonas macrocíclicas, ivermectinas e milbemicinas. Os ectoparasiticidas incluem piretróides e piretróides sintéticos, organofosforados, karmates, lactonas macrocíclicas, formamidinas, pirazoles, neonicotinóides, espinosinas, semicarbazonas, isoxazolininas e reguladores de crescimento de insetos (Selzer & Epe, 2021). Os antiparasitários químicos sintéticos, embora ofereçam proteção contra diversos tipos de parasitas, geram contaminação do meio ambiente e isto é motivo de crescente preocupação (Orive & Lertxundi, 2020). Resíduos de produtos comumente utilizados no controle de artrópodes e nematoides que afetam a pecuária, como exemplo a ivermectina, podem ter efeitos prejudiciais na biodiversidade diminuindo as populações de besouros envolvidos nos processos de degradação do esterco, que contribui para melhorar as propriedades e funções do solo (Verdú et al., 2018).

Outra questão preocupante é o fato dos parasitas adquirirem resistência a antiparasitários químicos sintéticos, principalmente anti-helmínticos em ovinos, caprinos, bovinos, cavalos e aves de capoeira, e cujos mecanismos de resistência têm sido amplamente estudados (Samson-Himmelstjerna et al., 2009; Sangster et al., 2018). Espécies como *Haemonchus contortus*, uma das parasitas gastrointestinais de maior importância em ruminantes, têm demonstrado grande capacidade de desenvolver resistência a todas as principais classes de medicamentos (Benzimidazoles, Imidazothiazoles, Macrocylic lactones, Closantel), causando grandes prejuízos em todo o mundo (Kotze and Prichard, 2016). Os artrópodes ectoparasitos de animais como os carrapatos são transmissores das doenças mais nocivas e o uso de acaricidas sintéticos é o principal método de controle, porém, casos de resistência também representa um dos principais problemas globais (Abbas et al., 2014; Rodriguez-Vivas et al., 2018; Yessinou et al., 2018; Godara et al., 2019; Thomas et al., 2020; Chitombo et al., 2021).

Para reduzir a contaminação ambiental e diminuir a resistência aos antiparasitários, diversas estratégias precisam ser adotadas, dentre elas, a fabricação de medicamentos à base de princípios ativos que ofereçam mecanismos de ação com menor risco de resistência e também com menor impacto negativo ao meio ambiente.

4. PROTEASES DE CISTEÍNA VEGETAL COMO ALTERNATIVA SUSTENTÁVEL

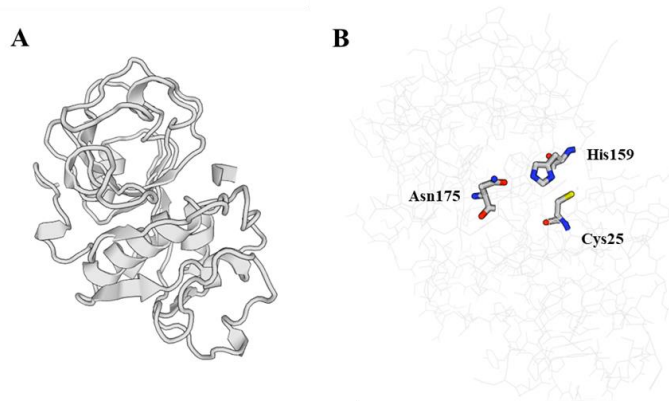
Enzimas são proteínas que catalisam reações bioquímicas de forma eficiente e exibem não apenas funções importantes nos processos metabólicos celulares, mas também têm aplicações em diferentes indústrias (Gimenes et al., 2021). As proteases (EC 3.4) são uma classe de enzima conhecida por catalisarem a hidrólise de ligações peptídicas das proteínas por meio da polarização do grupo carboxila da ligação peptídica do substrato. Dependendo dos resíduos presentes no sítio ativo, elas são classificadas em quatro grupos: proteases de cisteína, proteases de serina, metaloproteases e proteases aspárticas (Ward, 2011; Sebastián et al., 2018).

As proteases de cisteína (EC.3.4.22) exibem uma estrutura central conservada, composta por dois domínios de interação claramente diferenciados, uma α -hélice e um tipo β -folha que foram denominados domínios L e R de acordo com sua posição na orientação padrão (Fernández-Lucas et al., 2017). As cisteíno proteases são enzimas com massa molecular de aproximadamente 21-30 kDa e podem ser subdivididas em exopeptidases (por exemplo, catepsina X, carboxipeptidase B) e endopeptidases (por exemplo: papaína, bromelina, ficina) (Grzonka et al., 2007). As CPs são divididas em dez clãs: CA, CD, CE, CF, CH, CL, CM, CN, CO e C-, e CPs de plantas pertencentes a cinco deles foram descritos (CA, CD, CF, CO e EC). A maioria dos PCs de plantas pertence à família C1, conhecida como família da papaína (CA) (Rawlings et al., 2010). As proteases de cisteína de tipo papaína (PLCPs), são estruturalmente caracterizados por um domínio típico de dobra semelhante a papaína (Figura 1) (um domínio de α -hélice e β -folha, e a tríade catalítica Cys-His-Asn é formada na interface de dois domínios) (Rawlings et al., 2016).

Na primeira classificação de 138 PLCPs vegetais, oito subfamílias foram identificadas com base em suas características estruturais, mais tarde, 723 PLCPs de plantas foram determinados e agrupados em nove classes de acordo com a arquitetura de domínio e sua homologia (Kordiš & Turk, 2009; Richau et al., 2012). As cisteíno proteases (CPs) vegetais estão relacionadas a diversas funções fisiológicas, participando de processos como o desenvolvimento e maturação dos frutos, das proteínas de armazenamento durante a germinação, estão envolvidas nas fases de maturação, morfogênese, biogênese celular e senescência (Domsalla & Melzig, 2008; Liu et al., 2018). Enquanto isso, os CPs desempenham um papel crítico sob o ataque herbívoro e ativam os mecanismos de resistência nas plantas (Misas-Villamil et al., 2016). Por exemplo, a papaína, uma das CPs do látex, pode estar

envolvida nos mecanismos de proteção induzidos por insetos herbívoros em *Carica papaya* (Konno et al., 2004).

Figura 13 - Estrutura da papaína de *Carica papaya*.



Legenda: (A) Estrutura tridimensional do domínio peptidase da papaína (UniProtKB P00784 (PAPA1_CARPA)). (B) Resíduos catalíticos no sítio ativo da papaína. Cys25 e His159 formam a díade catalítica.

Fonte: Todas as imagens foram preparadas usando <https://swissmodel.expasy.org>.

Por outro lado, CPs provenientes de *C. papaya* (papaína, quimopapaína, caricaína, glicilendopeptidase), *Ananas comosus* (bromelina do fruto, bromelina do caule, ananaína, comosaína) e *Ficus glabrata* (ficina) são de importância comercial devido à sua forte atividade proteolítica contra uma ampla gama de substratos proteicos e porque são ativos em uma ampla faixa de pH e temperatura (Feijoo-Siota & Villa, 2011; Grzonka et al., 2007). Embora apenas algumas proteases derivadas de plantas estejam disponíveis para aplicação industrial, a atividade enzimática foi encontrada em várias frutas e vegetais. Por exemplo, Sun et al. (2016), em uma análise comparativa sobre atividades de protease em diferentes valores de pH; encontrou que de 90 recursos vegetais, incluindo frutas e hortaliças, dez frutas e treze hortaliças apresentaram atividades de protease acima de 10 U/g. Além disso, atividades de protease elevadas foram detectadas em kiwi (28,8 U/g), brócolis (16,9 U/g), gengibre (16,6 U/g), alho-poró (32,7 U/g) e pimentão vermelho (15,8 U/g) em diferentes valores de pH.

Em geral, as proteases de cisteína possuem várias aplicações industriais (Tabela 1), e.g.: podem melhorar a qualidade da ração em animais, aumentando a digestibilidade da ração (Sharma et al., 2021), têm potencial clínico significativo como agentes ativos para a preparação de corante de removedores de esmalte dentário (Münchow et al., 2016), têm um alto potencial para serem usados na tecnologia de imobilização enzimática para tratamento de efluentes industriais (Metin and Alver, 2016), encurtam o tempo de maturação da cerveja, garantindo

melhor liquefação adjacente e produzindo baixo teor de carboidratos cerveja (Meshram et al., 2019), aumentar a textura geral e palatabilidade da carne, especialmente carne bovina (Gagaoua et al., 2021), catalisar a hidrólise do glúten, para que a massa para assar pão possa ser facilmente preparada (Meshram et al., 2019). Além disso, possui propriedades fibrinolíticas, anti-edematosas, antitrombóticas e anti-inflamatórias, benefícios terapêuticos como tratamento de angina pectoris, bronquite, sinusite, trauma cirúrgico e tromboflebite, desbridamento de feridas e melhora da absorção de fármacos, principalmente antibióticos (Chakraborty et al., 2021).

Tabela 1 Principais aplicações industriais de proteases de cisteína

Aplicação	Enzimas	Usos	Referência
Alimentação animal	Bromelina, Papaína	Aumentar a disponibilidade e inversão de proteínas	(Sharma et al., 2021)
Eliminação de resíduos (efluentes)	Papaína	Remoção de mercúrio de sua solução aquosa	(Metin & Alver, 2016)
Indústria cervejeira	Bromelina, Papaína	Remove a turvação durante o armazenamento de cervejas, dividindo proteínas no malte	(Meshram et al., 2019)
Indústria cosmética	Bromelina, Papaína, Ficina	Remoção de manchas de proteínas, clareamento dos dentes, pode ajudar a dissipar tachas e espinhas, limpar o rosto	(Kalyana et al., 2011) (Yao et al., 2013) (Münchow et al., 2016)
Indústria de alimentos	Bromelina, Papaína, Zingibain, Ficina, Actinidina	Amaciante de carne, fazer proteínas solúveis, cereais e bebidas, estabilização de gelatina, maturação de alimentos	(Hu et al., 2020) (Gagaoua et al., 2021)
Indústria de laticínios	Zingerbain, Bromeína e Papaina	Hidrolisado de soro de leite, adoçante, maturação de queijo	(Abe et al., 2015) (MUZIRA, 2019)
Indústria de panificação	Bromelina, Papaína, Ficina	Redução do nível de proteína da farinha na fabricação de biscoitos, relaxamento da massa, melhor volume do pão.	(Feijoo-Siota & Villa, 2011) (Li et al., 2016) (Meshram et al., 2019)
Indústria do couro	Bromelina	Depilatório para curtimento dos couros	(Andini et al., 2021)
Indústria farmacêutica e medicina	Bromelina, Papaína	Matar as células da leucemia linfática, probactérias, parasitas e bacilos tuberculosos, ajudando a diminuir a inflamação, aliviar a dor e promover a digestão.	(MüLLER et al., 2016) (Chakraborty et al., 2021)
Indústria fotográfica	Bromelina, Papaína	Dissolve a gelatina do filme riscado permitindo que a prata presente seja recuperada	(Engidayehu & Sahu, 2020)
Indústria têxtil	Bromelina, Papaína	Usado para processar lã, fervura de casulos e refino de sedas	(Koh et al., 2006) (Ninpetch et al., 2015)

Fonte: Do Autor (2022)

5. PROTEASES DE CISTEÍNA VEGETAL COM ATIVIDADES BIOPESTICIDAS

Artrópodes pragas e fitoparasitos representam um dos maiores problemas para as culturas agrícolas, pois reduzem a produção, o que compromete a segurança alimentar. O controle atual depende fortemente de agrotóxicos sintéticos que, apesar de eficazes, são questionados devido aos seus efeitos nocivos. Uma alternativa sustentável é o uso de biopesticidas que, por sua natureza, são mais seguros para o meio ambiente, usuário e organismos não-alvo. As plantas produzem substâncias de defesa em resposta ao ataque de herbívoros. Um exemplo claro é o látex, uma emulsão pegajosa exsudada em resposta a uma lesão física (Agrawal, and Konno, 2009).

Compostos pré-formados em látex, como proteases, quitinases e proteínas de ligação à quitina, desempenham importantes papéis defensivos contra micróbios e/ou insetos (Ramos et al., 2019). Muitas dessas proteases são cisteíno proteases, embora também tenham sido observadas metaloproteases tóxicas para insetos e serino proteases. Os locais de atividade de protease tóxica variam desde o intestino médio do inseto até a hemocele (cavidade do corpo) e cutícula (Harrison and Bonning, 2010). As cisteíno proteases, presentes em alguns frutos e no látex de plantas, têm sido relatadas como uma alternativa promissora para o controle de diversas pragas (Tabela 2). Por exemplo, proteases de cisteína presentes em *Carica papaya* e *Ficus virgata*, demonstraram causar forte toxicidade e inibição de crescimento contra larvas de Lepidoptera, sugerindo que o látex vegetal e as proteínas que ele contém, cisteíno proteases, em particular, fornecem às plantas um mecanismo geral de defesa contra insetos herbívoros (Konno et al., 2004).

Wijanarko et al. (2017) demonstraram que o extrato de papaína (látex de folhas de mamão, casca de mamão e frutos de mamão) foi poderoso o suficiente para matar *Spodoptera litura*, uma das principais pragas da pimenta vermelha (*Capsicum annuum*). Da mesma forma, actinidina, uma cisteína protease do kiwi (*Actinidia deliciosa*), demonstrou afetar o crescimento e a sobrevivência de *S. litura* (Malone et al., 2005). Foi avaliada a atividade bioinsecticida da zingibaína, uma cisteína protease do gengibre vermelho (*Zingiber officinale* var. *Rubrum*), sobre a lagarta do cartucho (*Spodoptera* sp.) embora a pesquisa tenha mostrado alta atividade enzimática, extrato de gengibre vermelho bruto não foi forte o suficiente para matá-los (Afnan et al., 2018). Em quanto a isso, a entrega de cisteíno proteases por meio de nanoencapsulação foi recentemente investigada como uma ferramenta biológica promissora para o controle de insetos-praga (Batoool et al., 2021).

As CPs também são conhecidas por atuarem na digestão da cutícula de nematoides. Stepek et al. (2007) mostraram que papaína pura do mamão (*Carica papaya*), látex bruto de mamão (*C. papaya*), bromelina do caule do abacaxi (*Ananas comosus*) e actinidina do suco de Kiwi (*Actinidia chinensis*) causaram digestão da cutícula e diminuição da atividade de dois nematoides *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* e algumas proteínas cisteína também afetaram os juvenis de segundo estágio de *Globodera rostochiensis*. Da mesma forma, foi relatado que as proteases presentes no látex de *Euphorbia milii* (milina e miliina), possuem atividade nematicida, causando reduções de 65,59% após 24 horas e 96,46% após 48 horas. em juvenis de *Panagrellus redivivus* (Sufiate et al., 2017).

Além disso, foi relatado que *Synadenium grantii*, uma planta Euphorbiaceae comumente encontrada no Brasil, contém proteases com atividade nematicida, causando 100% de mortalidade no nematoide fitoparasitas *Meloidogyne incognita* e 72% em *Panagrellus redivivus* (Gomes et al., 2018). Sufiate et al. (2021) purificaram três proteases presentes no látex de *Euphorbia trigona*, denominadas neste estudo trigonina 1, 2 e 3, e cujos pesos moleculares encontrados foram, respectivamente, 36, 31 e 29 kDa. Os autores descobriram que o extrato bruto do látex contendo as três proteases de *E. trigona* reduziu o número de jovens vivos de *M. incognita* foi reduzido em 96% após 24 horas de tratamento.

A fim de controlar fungos de importância agrônômica, o efeito fungicida das proteases de cisteína também tem sido estudado. López-García et al. (2012) avaliaram o efeito da bromelaína isolada de abacaxi (*Ananas comosus*), sobre o crescimento de *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium proliferatum*. O estudo demonstrou que a bromelaína do caule apresenta uma potente atividade antifúngica contra fitopatógenos e sugere seu potencial uso como agente eficaz na proteção de cultivos.

O controle de bactérias fitopatogênicas por proteases de cisteína ainda não foi relatado. No entanto, foram relatados estudos do efeito antibacteriano de *Bromelia karatas* L. rico em proteases de cisteína (ananaína e bromelaína) com atividade antibacteriana contra patógenos de origem alimentar *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium* (Avalos-Flores et al., 2022).

6. PROTEASES DE CISTEÍNA VEGETAL COM ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

Tanto pragas ectoparasitos quanto pragas endoparasitos causam sérios problemas na pecuária, afetando o bem-estar animal e reduzindo a produção. O maior problema atual, além dos efeitos colaterais ambientais, é o fato de que a maioria dos parasitos está se tornando resistente à maioria das drogas sintéticas. Nesse contexto, esforços estão sendo feitos (Tabela 2) para encontrar alternativas sustentáveis para o controle desses parasitos (de León et al., 2020; Selzer & Epe, 2021).

Domingues et al. (2013) relataram pela primeira vez um estudo do efeito do extrato aquoso de casca de abacaxi e bromelina extraída do caule sobre larvas de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, o extrato de frutos e a bromelina a 500 mg/mL apresentaram inibição de oviposição de 39,1% e 41,1%, inibição de eclosão de 33,3% e 0%, reprodução estimada de 42 e 65 e percentual de eficácia de 59,4% e 55,7%, respectivamente, no entanto, nenhuma das diluições testadas foi eficaz contra as larvas de *R. (Boophilus) microplus*. Por outro lado, Juasook et al. (2018) investigaram os efeitos in vitro de extratos de casca e coração de abacaxi em fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus*, e constataram que esses extratos podem ser considerados potentes agentes naturais, pois reduzem a reprodução de fêmeas de *R. sanguineus* e controlam a população de carrapatos. Da mesma forma, Filgueiras et al. (2021) investigaram a atividade do látex de frutos de *C. papaya* L. em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e constataram que todas as concentrações de látex ativo causaram mortalidade média significativa em larvas de *R. microplus*. Além disso, observou-se diminuição do peso da massa de ovos em fêmeas tratadas com látex de mamão ativo ou látex desnaturado em relação ao seu grupo controle tratado apenas com água destilada.

Em relação aos endoparasitas animais, sabe-se há muito tempo que as proteases de cisteína possuem propriedades anti-helmínticas (Satrija et al., 1995; de Amorin et al., 1999). A cutícula do nematoide é composta de colágeno e cuticulína, e estudos recentes mostram que essas proteínas da cutícula do nematóide são alvos moleculares para cisteínas de proteínas vegetais (Njom et al., 2021). Assim, vários estudos têm sido publicados demonstrando o efeito anti-helmíntico. Hunduza et al. (2020) demonstraram que a bromelaína encapsulada tem atividade anti-helmíntica sobre ovos, larvas e vermes adultos do parasita *H. contortus*, indicando que a encapsulação de bromelina pode ser avaliada como um novo medicamento anti-helmíntico para controle de *H. contortus* em ruminantes.

A cisteína protease do látex de *Ficus benjamina* também exibe atividade anti-helmíntica contra *H. contortus*, já que foi relatado inibição tanto no desenvolvimento quanto o desembainhamento das larvas com 50% de inibição nas concentrações de 0,26 e 0,79 mg/mL, respectivamente (Wanderley et al., 2018). Peachey et al. (2016) demonstraram eficácia anti-helmíntica das PCs frente a helmintos parasitas de equinos, já que se observou um potente efeito anti-parasítico no teste da escotilha de ovos, atribuindo esse efeito às proteases de cisteína do látex de mamão. Da mesma forma, Mansur et al. (2016) relataram que CPs do látex do mamão, e também os de abacaxi, são altamente eficazes contra o cestoide de equino *Anoplocephala perfoliata*, causando uma redução significativa da motilidade e levando à morte dos vermes, indicando que essas enzimas derivadas de plantas podem ser desenvolvidas em anthelmínticos úteis de amplo espectro.

Tabela 2 Proteases de cisteína com atividade biopesticidas e antiparasitária

Enzimas	Planta (parte da planta)	Atividade	Praga alvo	Referência
Papaína, Ficina	<i>Carica papaya</i> (Látex de folhas), <i>Ficus virgata</i> (Látex de folhas)	Inseticida	larvas de <i>Samia ricini</i> (Saturniidae) e duas pragas polifagas, <i>mamestra brassicae</i> (Noctuidae) e <i>Spodoptera litura</i> (Noctuidae)	(Konno et al., 2004)
Papaína	<i>Carica papaya</i> (Látex de folhas, casca de frutos e frutos)	Inseticida	<i>Spodoptera litura</i> (Noctuidae)	(Wijanarko et al., 2017)
Actinidina	<i>Actinidia deliciosa</i> (frutos)	Inseticida	<i>Spodoptera litura</i> (Noctuidae)	(Malone et al., 2005)
Zingibaína	<i>Zingiber officinale</i> (Rizomas)	Inseticida	<i>Spodoptera sp.</i>	(Afnan et al., 2018)
Papaína, Bromelina e Actinidina	<i>Ananas comosus</i> (Caule), <i>Carica papaya</i> (Látex de frutos) e <i>Actinidia deliciosa</i> (frutos)	Nematicida	<i>Meloidogyne incognita</i> e <i>Meloidogyne javanica</i> e juvenis de segundo estágio de <i>Globodera rostochiensis</i>	(Stepek et al., 2007)
Milina e Miliina	<i>Euphorbia milii</i> (Látex)	Nematicida	<i>Panagrellus redivivus</i>	(Sufiate et al., 2017)
Trigonina	<i>Euphorbia trigona</i> (Látex)	Nematicida	<i>Meloidogyne incognita</i>	Sufiate et al. (2021)
Bromelina	<i>Ananas comosus</i> (caule)	Fungicida	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Fusarium proliferatum</i>	(López-García et al. 2012)

Bromelina	<i>Ananas comosus</i> (frutos e caule)	Acaricida	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i> e <i>Rhipicephalus</i> <i>sanguineus</i>	(Domingues et al. 2013 e Juasook et al. 2018)
Papaína	<i>Carica papaya</i> (Látex de frutos)	Acaricida	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	(Filgueiras et al. 2021)
Bromelina	<i>Ananas comosus</i> (frutos)	Anti- helmíntica	<i>Haemonchus contortus</i>	(Hunduza et al. 2020)
Ficina	<i>Ficus benjamina</i> (Látex)	Anti- helmíntica	<i>Haemonchus contortus</i>	(Wanderley et al., 2018)
Papaína, Bromelina	<i>Carica papaya</i> (Látex de frutos) e <i>Ananas</i> <i>comosus</i> (frutos e caule)	Anti- helmíntica	<i>Anoplocephala</i> <i>perfoliata</i>	(Mansur et al., 2016)
Papaína	<i>Carica papaya</i> (Látex de frutos)	Anti- helmíntica	Ciatostomíneos	(Peachey et al., 2016)

Fonte: Do Autor (2022)

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

De acordo com os estudos aqui citados, as proteases de cisteína vegetal parecem ser uma alternativa promissora para o controle sustentável de pragas agrícolas e parasitas de animais. Nesse sentido, dentro das alternativas promissoras das proteases de cisteína para o controle de pragas, está o desenvolvimento de biopesticidas e antiparasitários como métodos sustentáveis. Por outro lado, há o desenvolvimento de plantas resistentes a pragas e patógenos. Em quanto a isso, a família genética PLCPs além do *C. papaya*, *Ananas comosus*, *Ficus carica*, *Actinidia deliciosa*, também foram identificadas no genoma de *Arabidopsis*, *Ricinus communis* L. (Zou et al., 2018), *Hevea brasiliensis* L. (Zou et al., 2017), *Zea mays* (Schulze et al., 2019), *Oryza sativa* (Niño et al., 2020), *Glycine max* (Yuan et al., 2020), *Gossypium hirsutum* (Zhang et al., 2019) e *Vitis vinifera* L. (Kang et al., 2021), destacando as cisteíno-proteases como elementos centrais na imunidade das plantas, o que abriria uma alternativa de melhoramento genético para obtenção de culturas resistentes a pragas e patógenos.

No entanto, ainda há muitos estudos que precisam ser feitos para melhorar nossa compreensão dos mecanismos de ação das cisteíno proteases. Por exemplo, como a eficácia dessas enzimas pode variar de uma fonte vegetal para outra? É possível que ao desenvolver plantas capazes de aumentar a produção dessas enzimas, elas também possam aumentar a resistência a pragas? Como os mecanismos de ação dessas enzimas podem se comportar em diferentes espécies de pragas e parasitas? Como a especificidade pode ser alcançada? Seria possível melhorar a eficácia dessas enzimas combinando-as com outras substâncias?

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro das agências CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Funding

Esta pesquisa foi apoiada por bolsas da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) (nº APQ-02466-21) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Brasil para o fornecimento de mestrado. bolsas para Castro, HLB.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesse que possa ser percebido como prejudicial à imparcialidade da pesquisa relatada

8. REFERÊNCIAS

- Abbas, R. Z., Zaman, M. A., Colwell, D. D., Gilleard, J., & Iqbal, Z. (2014). Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. *Veterinary parasitology*, 203(1-2), 6-20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.006>
- Abe, N., Wu, C. Y., Kim, Y. K., Fujii, T., & Abe, K. (2015). Development of an efficient soymilk cream production method by papain digestion, heat treatment, and low-speed centrifugation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(11), 1890-1892. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1050990>
- Abubakar, M., Iqbal, A., Manzoor, S., & Arshed, M. J. (2020). Introductory Chapter: Livestock Health and Farming-Regional to Global Perspectives. *Livestock Health and Farming*, 3.
- Afnan, N. T., Nur, D. F., Utami, T. S., Sahlan, M., Wijanarko, A., & Hermansyah, H. (2018, March). Producing armyworm (*spodoptera sp.*) Bioinsecticide based on cysteine protease of red ginger (*zingiber officinale* var. *Rubrum*). In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 316, No. 1, p. 012062). IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/316/1/012062>
- Agrawal, A. A., & Konno, K. (2009). Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 40, 311-331. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120307>
- Andini, R. A., Mustakim, M., & Thohari, I. (2021). The Use of Pineapple Fruit in Batting Process on the Chemical Properties of Sheepskin Using Shorfloat Tanning. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Hasil Ternak (JITEK)*, 16(3), 166-173. <https://doi.org/10.21776/ub.jitek.2021.016.03.3>
- Ávalos-Flores, E., López-Castillo, L. M., Wielsch, N., Hupfer, Y., Winkler, R., & Magaña-Ortiz, D. (2022). Protein extract of *Bromelia karatas* L. rich in cysteine proteases (ananain-and bromelain-like) has antibacterial activity against foodborne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium. *Folia Microbiologica*, 67(1), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00906-9>
- Ávalos-Flores, E., López-Castillo, L.M., Wielsch, N., Hupfer, Y., Winkler, R., & Magaña-Ortiz, D. (2021). Protein extract of *Bromelia karatas* L. rich in cysteine proteases (ananain-and bromelain-like) has antibacterial activity against foodborne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium. *Folia Microbiologica*, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00906-9>
- Batool, M., Hussain, D., Akrem, A., ul Haq, M. N., Saeed, S., & Saeed, Q. (2021). Nanoencapsulation of cysteine protease for the management of stored grain pest, *Sitotroga cerealella* (Olivier). *Journal of King Saud University-Science*, 33(4), 101404. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101404>
- Bilal, M., Iqbal, H. M., & Barceló, D. (2019). Persistence of pesticides-based contaminants in the environment and their effective degradation using laccase-assisted biocatalytic systems.

Science of The Total Environment, 695, 133896.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133896>

Buttle, D. J., & Mort, J. S. (2013). Cysteine proteases. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00009-8>

Campos, E. V., Proença, P. L., Oliveira, J. L., Bakshi, M., Abhilash, P. C., & Fraceto, L. F. (2019). Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. *Ecological Indicators*, 105, 483-495. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.038>

Carvalho, Fernando P. "Pesticides, environment, and food safety." *Food and energy security* 6.2 (2017): 48-60. <https://doi.org/10.1002/fes3.108>

Chakraborty, A. J., Mitra, S., Tallei, T. E., Tareq, A. M., Nainu, F., Cicia, D., ... & Capasso, R. (2021). Bromelain a potential bioactive compound: a comprehensive overview from a pharmacological perspective. *Life*, 11(4), 317. <https://doi.org/10.3390/life11040317>

Chitombo, L., Lebani, K., & Sungirai, M. (2021). Acaricide resistance in *Rhipicephalus appendiculatus* ticks collected from different farming systems in Zimbabwe. *Tropical Animal Health and Production*, 53(4), 1-5. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02881-2>

Culliney, T. W. (2014). Crop losses to arthropods. In *Integrated pest management* (pp. 201-225). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7796-5_8

de Amorin, A., Borba, H. R., Carauta, J. P., Lopes, D., & Kaplan, M. A. (1999). Anthelmintic activity of the latex of *Ficus* species. *Journal of ethnopharmacology*, 64(3), 255-258. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00139-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00139-1)

de León, A. A. P., Mitchell III, R. D., & Watson, D. W. (2020). Ectoparasites of cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 36(1), 173-185. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.12.004>

de Souza Guida, Y., Meire, R. O., Torres, J. P. M., & Malm, O. (2018). Air contamination by legacy and current-use pesticides in Brazilian mountains: an overview of national regulations by monitoring pollutant presence in pristine areas. *Environmental pollution*, 242, 19-30. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.061>

Deknock, A., De Troyer, N., Houbraken, M., Dominguez-Granda, L., Nolivos, I., Van Echelpoel, W., ... & Goethals, P. (2019). Distribution of agricultural pesticides in the freshwater environment of the Guayas river basin (Ecuador). *Science of the Total Environment*, 646, 996-1008. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.185>

Domingues, L. F., Giglioti, R., Feitosa, K. A., Fantatto, R. R., Rabelo, M. D., de Sena Oliveira, M. C., ... & de Souza Chagas, A. C. (2013). In vitro activity of pineapple extracts (*Ananas comosus*, Bromeliaceae) on *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental parasitology*, 134(3), 400-404. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.021>

Domsalla, A., & Melzig, M. F. (2008). Occurrence and properties of proteases in plant latices. *Planta medica*, 74(07), 699-711.

- Engidayehu, A., & Sahu, O. (2020). Enzymatic recovery of silver from waste radiographic film: optimize with response surface methodology. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 15, 100224. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100224>
- Feijoo-Siota, L., & Villa, T. G. (2011). Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 1066-1088. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0431-4>
- Fernández-Lucas, J., Castañeda, D., & Hormigo, D. (2017). New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 91-101. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.017>
- Filgueiras, M. D., Barreto, L. P., Fernandes, É. K., & Soares, F. E. (2021). Activity of papaya (*Carica papaya*) latex on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *International Journal of Acarology*, 47(7), 638-642. <https://doi.org/10.1080/01647954.2021.1980611>
- Finegold, C., Ried, J., Denby, K., & Gurr, S. (2019). Global burden of crop loss. *Gates Open Res*, 3. <https://doi.org/10.21955/gatesopenres.1116448.1>
- Gagaoua, M., Dib, A. L., Lakhdara, N., Lamri, M., Botineştean, C., & Lorenzo, J. M. (2021). Artificial meat tenderization using plant cysteine proteases. *Current Opinion in Food Science*, 38, 177-188. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.002>
- Gimenes, N. C., Silveira, E., & Tambourgi, E. B. (2021). An overview of proteases: production, downstream processes and industrial applications. *Separation & Purification Reviews*, 50(3), 223-243. <https://doi.org/10.1080/15422119.2019.1677249>
- Godara, R., Katoch, R., Rafiqi, S. I., Yadav, A., Nazim, K., Sharma, R., ... & Katoch, M. (2019). Synthetic pyrethroid resistance in *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* ticks from north-western Himalayas, India. *Tropical animal health and production*, 51(5), 1203-1208. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01810-8>
- Gomes, E. H., Soares, F. E. F., Souza, D. C., Lima, L. T., Sufiate, B. L., Ferreira, T. F., & Queiroz, J. H. (2018). Role of *Synadenium grantii* latex proteases in nematicidal activity on *Meloidogyne incognita* and *Panagrellus redivivus*. *Brazilian Journal of Biology*, 79, 665-668. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.188129>
- Grzonka, Z., Kasprzykowski, F., & Wiczak, W. (2007). Cysteine proteases. In *Industrial enzymes* (pp. 181-195). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_11
- Hafid, K., John, J., Sayah, T. M., Domínguez, R., Becila, S., Lamri, M., ... & Gagaoua, M. (2020). One-step recovery of latex papain from *Carica papaya* using three phase partitioning and its use as milk-clotting and meat-tenderizing agent. *International journal of biological macromolecules*, 146, 798-810. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.048>
- Harrison, R. L., & Bonning, B. C. (2010). Proteases as insecticidal agents. *Toxins*, 2(5), 935-953. <https://doi.org/10.3390/toxins2050935>

- Hashimi, M. H., Hashimi, R., & Ryan, Q. (2020). Toxic effects of pesticides on humans, plants, animals, pollinators and beneficial organisms. *Asian plant research journal*, 37-47.
- Hu, R., Chen, G., & Li, Y. (2020). Production and characterization of antioxidative hydrolysates and peptides from corn gluten meal using papain, ficin, and bromelain. *Molecules*, 25(18), 4091. <https://doi.org/10.3390/molecules25184091>
- Hunduza, A., Kagira, J., Maina, N., Andala, D., Cheruiyot, K., & Kahiro, S. (2020). In vitro anthelmintic activity of chitosan encapsulated bromelain against eggs, larval and adult stages of *Haemonchus contortus*. *J Appl Life Sci Int*, 23, 28-38. 10.9734/jalsi/2020/v23i330151
- Juasook, A., Boonmars, T., Artchayasawat, A., Pumhirunroj, B., Boonjaraspinyo, S., Sriraj, P., & Aukkanimart, R. (2018). Effect of pineapple extracts on the reproduction of *Rhipicephalus sanguineus* semi-engorged females. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, 13, 339-345. DOI: 10.3923/ajava.2018.339.345
- Kalyana, P., Shashidhar, A., Meghashyam, B., Sreevidya, K. R., & Sweta, S. (2011). Stain removal efficacy of a novel dentifrice containing papain and Bromelain extracts—an in vitro study. *International journal of dental hygiene*, 9(3), 229-233. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5037.2010.00473.x>
- Kang, J., Gong, P., Ge, M., Sadeghnezhad, E., Liu, Z., Zhang, M., ... & Fang, J. (2021). The PLCP gene family of grapevine (*Vitis vinifera* L.): characterization and differential expression in response to *Plasmopara Viticola*. *BMC plant biology*, 21(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03279-w>
- Karasali, H., & Maragou, N. (2016). Pesticides and herbicides: Types of pesticide. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00535-3>
- Koh, J., Kang, S. M., Kim, S. J., Cha, M. K., & Kwon, Y. J. (2006). Effect of pineapple protease on the characteristics of protein fibers. *Fibers and Polymers*, 7(2), 180-185. <https://doi.org/10.1007/BF02908264>
- Konno, K., Hirayama, C., Nakamura, M., Tateishi, K., Tamura, Y., Hattori, M., & Kohno, K. (2004). Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *The Plant Journal*, 37(3), 370-378. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.2003.01968.x>
- Kordiš, D., & Turk, V. (2009). Phylogenomic analysis of the cystatin superfamily in eukaryotes and prokaryotes. *BMC evolutionary biology*, 9(1), 1-22.
- Kotze, A. C., & Prichard, R. K. (2016). Anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*: history, mechanisms and diagnosis. *Advances in parasitology*, 93, 397-428. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.012>
- Lengai, G. M., Muthomi, J. W., & Mbega, E. R. (2020). Phytochemical activity and role of botanical pesticides in pest management for sustainable agricultural crop production. *Scientific African*, 7, e00239. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00239>

- Li, Y., Yu, J., Goktepe, I., & Ahmedna, M. (2016). The potential of papain and alcalase enzymes and process optimizations to reduce allergenic gliadins in wheat flour. *Food Chemistry*, 196, 1338-1345. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.089>
- Liu, H., Hu, M., Wang, Q., Cheng, L., & Zhang, Z. (2018). Role of papain-like cysteine proteases in plant development. *Frontiers in plant science*, 1717. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01717>
- Liu, Y., Pan, X., & Li, J. (2015). A 1961–2010 record of fertilizer use, pesticide application and cereal yields: a review. *Agronomy for sustainable development*, 35(1), 83-93. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0259-9>
- López-García, B., Hernández, M., & Segundo, B. S. (2012). Bromelain, a cysteine protease from pineapple (*Ananas comosus*) stem, is an inhibitor of fungal plant pathogens. *Letters in applied microbiology*, 55(1), 62-67. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03258.x>
- Malone, L. A., Todd, J. H., Burgess, E. P. J., Philip, B. A., & Christeller, J. T. (2005). Effects of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) cysteine protease on growth and survival of *Spodoptera litura* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) fed with control or transgenic avidin-expressing tobacco. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 33(2), 99-105. <https://doi.org/10.1080/01140671.2005.9514337>
- Mansur, F. A. F., Luoga, W., Behnke, J. M., Buttle, D. J., Duce, I. R., & Garnett, M. C. (2021). Developing novel anthelmintics: the stability of cysteine proteinase activity in a supernatant extract of papaya latex. *Heliyon*, 7(10), e08125. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08125>
- Mansur, F., Luoga, W., Buttle, D. J., Duce, I. R., Lowe, A. E., & Behnke, J. M. (2016). The anthelmintic efficacy of natural plant cysteine proteinases against the equine tapeworm, *Anoplocephala perfoliata* in vitro. *Journal of helminthology*, 90(5), 561-568. <https://doi.org/10.1017/S0022149X15000759>
- Marinchenko, T. (2021). Entomophages as a Perspective Direction of Plant Protection. *KnE Life Sciences*, 374-383. <https://doi.org/10.18502/cls.v0i0.8968>
- Martínez, M., Cambra, I., González-Melendi, P., Santamaría, M. E., & Díaz, I. (2012). C1A cysteine-proteases and their inhibitors in plants. *Physiologia Plantarum*, 145(1), 85-94. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01569.x>
- Meshram, A., Singhal, G., Bhagyawant, S. S., & Srivastava, N. (2019). Plant-derived enzymes: a treasure for food biotechnology. In *Enzymes in food biotechnology* (pp. 483-502). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00028-1>
- Metin, A. Ü., & Alver, E. (2016). Fibrous polymer-grafted chitosan/clay composite beads as a carrier for immobilization of papain and its usability for mercury elimination. *Bioprocess and biosystems engineering*, 39(7), 1137-1149. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1590-0>
- Mfarrej, M. F. B., & Rara, F. M. (2019). Competitive, sustainable natural pesticides. *Acta Ecologica Sinica*, 39(2), 145-151. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.08.005>

- Misas-Villamil, J. C., van der Hoorn, R. A., & Doehlemann, G. (2016). Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity. *New Phytologist*, 212(4), 902-907. <https://doi.org/10.1111/nph.14117>
- MÜLLER, A. L. E. N. A., Barat, S., Chen, X., Bui, K. C., Bozko, P., Malek, N. P., & Plentz, R. R. (2016). Comparative study of antitumor effects of bromelain and papain in human cholangiocarcinoma cell lines. *International journal of oncology*, 48(5), 2025-2034. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3411>
- Münchow, E. A., Hamann, H. J., Carvajal, M. T., Pinal, R., & Bottino, M. C. (2016). Stain removal effect of novel papain-and bromelain-containing gels applied to enamel. *Clinical oral investigations*, 20(8), 2315-2320. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1840-1>
- MUZIRA, T. (2019). Comparative evaluation of milk clotting activity of bromelain, zingerbain and papain enzymes (Doctoral dissertation, Makerere University). <http://hdl.handle.net/20.500.12281/6882>
- Ninpetch, U., Tsukada, M., & Promboon, A. (2015). Mechanical properties of silk fabric degummed with bromelain. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 10(3), 155892501501000319. <https://doi.org/10.1177/155892501501000319>
- Niño, M. C., Kang, K. K., & Cho, Y. G. (2020). Genome-wide transcriptional response of papain-like cysteine protease-mediated resistance against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Plant Cell Reports*, 39(4), 457-472. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02502-1>
- Njom, V. S., Winks, T., Diallo, O., Lowe, A., Behnke, J., Dickman, M. J., ... & Buttle, D. J. (2021). The effects of plant cysteine proteinases on the nematode cuticle. *Parasites & vectors*, 14(1), 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04800-8>.
- Orive, G., & Lertxundi, U. (2020). Mass drug administration: time to consider drug pollution? *The Lancet*, 395(10230), 1112-1113. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30053-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30053-2)
- Özkara, A., Akyıl, D., & Konuk, M. (2016). Pesticides, environmental pollution, and health. In *Environmental health risk-hazardous factors to living species*. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/63094>
- Peachey, L. E., Pinchbeck, G. L., Matthews, J. B., Burden, F. A., Behnke, J. M., & Hodgkinson, J. E. (2016). Papaya latex supernatant has a potent effect on the free-living stages of equid cyathostomins in vitro. *Veterinary Parasitology*, 228, 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.036>
- Pérez-Lucas, G., Vela, N., El Aatik, A., & Navarro, S. (2019). Environmental risk of groundwater pollution by pesticide leaching through the soil profile. *Pesticides-use and misuse and their impact in the environment*, 1-28. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.82418>
- Ramos, M. V., Demarco, D., da Costa Souza, I. C., & de Freitas, C. D. T. (2019). Laticifers, latex, and their role in plant defense. *Trends in plant science*, 24(6), 553-567. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.03.006>

- Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A. S., ... & Kaushal, J. (2021). An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of Cleaner Production*, 283, 124657. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124657>
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Finn, R. (2016). Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research*, 44(D1), D343-D350. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1118>
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2010). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic acids research*, 38(suppl_1), D227-D233. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp971>
- Richau, K. H., Kaschani, F., Verdoes, M., Pansuriya, T. C., Niessen, S., Stüber, K., ... & Van der Hoorn, R. A. (2012). Subclassification and biochemical analysis of plant papain-like cysteine proteases displays subfamily-specific characteristics. *Plant physiology*, 158(4), 1583-1599. <https://doi.org/10.1104/pp.112.194001>
- Rodriguez-Vivas, R. I., Jonsson, N. N., & Bhushan, C. (2018). Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology research*, 117(1), 3-29. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5677-6>
- Rousis, N. I., Denardou, M., Alygizakis, N., Galani, A., Bletsou, A. A., Damalas, D. E., ... & Thomaidis, N. S. (2021). Assessment of Environmental Pollution and Human Exposure to Pesticides by Wastewater Analysis in a Seven-Year Study in Athens, Greece. *Toxics*, 9(10), 260. <https://doi.org/10.3390/toxics9100260>
- Sabarwal, A., Kumar, K., & Singh, R. P. (2018). Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders. *Environmental toxicology and pharmacology*, 63, 103-114. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.018>
- Samson-Himmelstjerna, G. V., Prichard, R. K., & Wolstenholme, A. J. (2009). Anthelmintic resistance as a guide to the discovery of new drugs? *Antiparasitic and antibacterial drug discovery: from molecular targets to drug candidates*, 17-32. <https://doi.org/10.1002/9783527626816.ch2>
- Sangster, N. C., Cowling, A., & Woodgate, R. G. (2018). Ten events that defined anthelmintic resistance research. *Trends in parasitology*, 34(7), 553-563. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.05.001>
- Satrija, F., Nansen, P., Murtini, S., & He, S. (1995). Anthelmintic activity of papaya latex against patent Heligmosomoides polygyrus infections in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 48(3), 161-164. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01298-R](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01298-R)
- Sebastián, D. I., Guevara, M. G., Rocío, T. F., & Virginia, T. C. (2018). An overview of plant Proteolytic enzymes. *Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes*, 1-19.
- Selzer, P. M., & Epe, C. (2021). Antiparasitics in animal health: Quo Vadis?. *Trends in Parasitology*, 37(1), 77-89. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.09.004>

- Sharma, S.A., Surveswaran, S., Arulraj, J., & Velayudhannair, K. (2021). Bromelain aumenta a digestibilidade da ração de peixe à base de Spirulina. *Revista de Ficologia Aplicada*, 33(2), 967-977. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02337-4>
- Sikandar, A., Zhang, M., Wang, Y., Zhu, X., Liu, X., Fan, H., & Duan, Y. (2020). Nematodes a risk to agriculture. *Applied Ecology and Environmental Research*, 18(1), 1679-1690. http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1801_16791690
- Schulze Hüynck, J., Kaschani, F., van der Linde, K., Ziemann, S., Müller, A. N., Colby, T., ... & Doehlemann, G. (2019). Proteases underground: Analysis of the maize root apoplast identifies organ specific papain-like cysteine protease activity. *Frontiers in plant science*, 10, 473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00473>
- Steppek, G., Curtis, R. H. C., Kerry, B. R., Shewry, P. R., Clark, S. J., Lowe, A. E., ... & Behnke, J. M. (2007). Nematicidal effects of cysteine proteinases against sedentary plant parasitic nematodes. *Parasitology*, 134(12), 1831-1838. <https://doi.org/10.1017/S0031182007003289>
- Sufiate, B. L., de Freitas Soares, F. E., de Freitas Ferreira, T., & de Queiroz, J. H. (2021). *Euphorbia trigona* latex nematicidal activity on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Research, Society and Development*, 10(9), e19910918037-e19910918037. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i9.18037>
- Sufiate, B. L., de Freitas Soares, F. E., Roberti, Á. S., & de Queiroz, J. H. (2017). Nematicidal activity of proteases from *Euphorbia milii*. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 10, 239-241. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.03.014>
- Sun, Q., Zhang, B., Yan, Q. J., & Jiang, Z. Q. (2016). Comparative analysis on the distribution of protease activities among fruits and vegetable resources. *Food chemistry*, 213, 708-713. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.029>
- Suteu, D., Rusu, L., Zaharia, C., Badeanu, M., & Daraban, G. M. (2020). Challenge of utilization vegetal extracts as natural plant protection products. *Applied Sciences*, 10(24), 8913. <https://doi.org/10.3390/app10248913>
- Thomas, D. B., Klafke, G., Busch, J. D., Olafson, P. U., Miller, R. A., Mosqueda, J., ... & Perez-De-Leon, A. (2020). Tracking the increase of acaricide resistance in an invasive population of cattle fever ticks (Acari: Ixodidae) and implementation of real-time PCR assays to rapidly genotype resistance mutations. *Annals of the Entomological Society of America*, 113(4), 298-309. <https://doi.org/10.1093/aesa/saz053>
- Verdú, J. R., Lobo, J. M., Sánchez-Piñero, F., Gallego, B., Numa, C., Lumaret, J. P., ... & Durán, J. (2018). Ivermectin residues disrupt dung beetle diversity, soil properties and ecosystem functioning: an interdisciplinary field study. *Science of the Total Environment*, 618, 219-228. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.331>
- Wanderley, L. F., Soares, A. M. D. S., Silva, C. R., Figueiredo, I. M. D., Ferreira, A. T. D. S., Perales, J., ... & Costa Junior, L. M. (2018). A cysteine protease from the latex of *Ficus benjamina* has in vitro anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 27, 473-480. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180070>

Ward, O. P. (2011). Proteases. *Comprehensive biotechnology*, 571. doi: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00222-1

Wijanarko, A., Nur, D. F., Sahlan, M., Afnan, N. T., Utami, T. S., & Hermansyah, H. (2017). Production of a Biopesticide Based on a Cysteine Protease Enzyme from Latex and Papaya (*Carica papaya*) for *Spodoptera Litura* in Red Chili Peppers (*Capsicum annuum*). *International Journal of Technology*, 8(8), 1455-1461. <https://doi.org/10.14716/ijtech.v8i8.788>

Yao, J. W., Xiao, Y., Zuo, Q. L., Zhang, Y., Tao, T., & Lin, C. J. (2013). Effectiveness of cysteine proteases on protein/pigment film removal. *Archives of Oral Biology*, 58(11), 1618-1626. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.07.015>

Yessinou, R. E., Akpo, Y., Sidick, A., Adoligbe, C., Karim, I. Y. A., Akogbeto, M., & Farougou, S. (2018). Evidence of multiple mechanisms of alphacypermethrin and deltamethrin resistance in ticks *Rhipicephalus microplus* in Benin, West Africa. *Ticks and tick-borne diseases*, 9(3), 665-671. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.02.013>

Zhang, S., Xu, Z., Sun, H., Sun, L., Shaban, M., Yang, X., & Zhu, L. (2019). Genome-wide identification of papain-like cysteine proteases in *Gossypium hirsutum* and functional characterization in response to *Verticillium dahliae*. *Frontiers in plant science*, 10, 134. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00134>

Yuan, S., Ke, D., Li, R., Li, X., Wang, L., Chen, H., ... & Zhou, X. (2020). Genome-wide survey of soybean papain-like cysteine proteases and their expression analysis in root nodule symbiosis. *BMC plant biology*, 20(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02725-5>

ZOU, Zhi et al. Genome-wide comparative analysis of papain-like cysteine protease family genes in castor bean and physic nut. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18760-6>.

ZOU, Zhi; XIE, Guishui; YANG, Lifu. Papain-like cysteine protease encoding genes in rubber (*Hevea brasiliensis*): comparative genomics, phylogenetic, and transcriptional profiling analysis. *Planta*, v. 246, n. 5, p. 999-1018, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2739-z>