



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS/ CB
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

Beatriz Godoy Roncalli

IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEASE E ANÁLISE DE TOXICIDADE DE
EXTRATOS PROTEICOS DE PALMA FORRAGEIRA (*Opuntia stricta*)

Recife
2025

Beatriz Godoy Roncalli

IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEASE E ANÁLISE DE TOXICIDADE DE
EXTRATOS PROTEICOS DE PALMA FORRAGEIRA (*Opuntia stricta*)

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas Bacharelado da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior

Coorientador (a): Dr. Lucas Carvalho de Freitas

Recife

2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Roncalli , Beatriz Godoy .

Identificação de inibidores de protease e análise de toxicidade de extratos proteicos de palma forrageira (*Opuntia stricta*) / Beatriz Godoy Roncalli . - Recife, 2025.

64p.

Orientador(a): Tercilio Calsa Júnior

Coorientador(a): Lucas Carvalho de Freitas

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2025.

Inclui referências.

1. Genética Vegetal. 2. Terapia . 3. Análise Toxicológica . 4. Proteômica. 5. Biotecnologia . I. Júnior , Tercilio Calsa. (Orientação). II. Freitas, Lucas Carvalho de . (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

Beatriz Godoy Roncalli

IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEASE E ANÁLISE DE TOXICIDADE DE
EXTRATOS PROTEICOS DE PALMA FORRAGEIRA (*Opuntia stricta*)

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas Bacharelado da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 29/07/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior
(Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Vilma Loreto da Silva
(Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Msc. Larissa Nascimento da Silva
(Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho à minha família, amigos e colegas de laboratório que estiveram comigo nos momentos difíceis e durante o preparo do meu trabalho de conclusão de curso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por todas as oportunidades e vivências que Ele sempre me proporcionou e também à minha família por todo o apoio e amor. Principalmente aos meus pais pelo encorajamento e suporte em todos os momentos, e aos meus irmãos por serem as pessoas mais especiais na minha vida. Quero agradecer também as minhas gatas pelo apoio emocional que sempre me deram.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Tercilio Calsa Junior por todo o apoio, dedicação, carinho e ensinamentos não apenas no meu TCC, mas nesses dois anos de estágio que fiz no LGPP. Sou muito grata por cada momento de acolhimento a mim dedicado tanto por ele como pela equipe do Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas.

Agradeço a todos os integrantes da equipe que compõem o LGPP. Todos sempre foram muito prestativos e dispostos a ajudar, além de terem me ensinado muito nos meus anos de graduação. Os ensinamentos que tive o prazer de adquirir vão além da minha vida acadêmica. Foi muito especial cada dia de trabalho, disciplina, congresso com vocês.

Agradeço ao meu coorientador, Dr. Lucas de Freitas, pela disponibilidade, dedicação, paciência e por todo o ensino e também pelo acolhimento quando entrei no laboratório.

Agradeço aos meus colegas e amigos da faculdade pela ajuda, companheirismo, carinho e trocados durante esses anos de graduação. Por todo o apoio e brincadeira nos momentos necessários, até mesmo nos momentos difíceis. Sou muito grata a todos que conheci e que tive o prazer de compartilhar a minha vida acadêmica.

Agradeço também ao CNPq pelo apoio financeiro e pela possibilidade de realizar esse projeto. Obrigada à todos!

“A ciência é construída com fatos, assim como uma casa é construída com pedras; mas uma coleção de fatos não é ciência, como um monte de pedras não é uma casa.” — Henri Poincaré

RESUMO

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro, rico em plantas adaptadas ao semiárido, como a palma forrageira (*Opuntia* spp.), usada na alimentação bovina e com potencial na medicina alternativa devido a seus compostos bioativos, especialmente inibidores de protease, com potencial terapêutico. Devido ao aumento do interesse por terapias biológicas, que são menos nocivas ao organismo do que compostos químicos, é essencial realizar testes toxicológicos para assegurar a segurança individual, social e ambiental. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar a toxicidade de extratos proteicos fracionados e enriquecidos com inibidores de protease obtidos dos cladódios de *Opuntia stricta*. Inicialmente, foram realizadas análises *in silico* em bancos de dados do gênero *Opuntia* para se obter informações sobre domínios conservados referentes a inibidores de protease. Em paralelo, foi realizada extração, precipitação e fracionamento do extrato bruto, visando obter inibidores que, posteriormente, passaram por quantificação e SDS-PAGE, para avaliar a integridade proteica dos extratos, tendo por fim o teste de toxicidade em modelo macrófita (lentilha-d'água) com diferentes doses dos extratos fracionados. Depois, foi feita espectrometria de massas LC-MS/MS para identificação dos inibidores de protease e realização de análises bioinformáticas, visando estudar as atividades biológicas realizadas pelos inibidores identificados. Os resultados demonstraram que a integridade proteica foi mantida e que os inibidores de protease foram identificados em diferentes frações, comprovando a eficiência dos métodos utilizados para fracionamento e a integridade do gel de poliacrilamida. A análise do teste de toxicidade demonstrou diferentes graus de inibição do crescimento das lentilhas-d'água (*Lemna aequinoctialis*) e processos de clorose na planta em diferentes extratos, mas com respostas similares em relação às dosagens. Os resultados apresentados mostraram considerável variedade de inibidores de protease presentes nas frações, com caráter importante para estudos futuros. Já os testes toxicológicos foram eficientes para o entendimento das dosagens menos danosas de proteínas, podendo servir até como referência para outros futuros estudos de toxicidade.

Palavras-chave: compostos bioativos; palma forrageira; terapias biológicas; toxicidade.

ABSTRACT

The Caatinga is an exclusively Brazilian biome, rich in plants adapted to semi-arid conditions, such as prickly pear (*Opuntia* spp.), which is used in cattle feed and has potential in alternative medicine due to its bioactive compounds, especially protease inhibitors with therapeutic potential. Given the large interest in biological therapies, which are less harmful to the body than chemical compounds, it is essential to conduct toxicological tests to ensure individual, social, and environmental safety. Therefore, the present study aimed to analyze the toxicity of protein extracts that were fractionated and enriched with protease inhibitors obtained from the cladodes of *Opuntia stricta*. Initially, *in silico* analyses were performed using databases of the *Opuntia* genus to obtain information about conserved domains related to protease inhibitors. In parallel, extraction, precipitation, and fractionation of the crude extract were carried out to obtain inhibitors, which were later subjected to quantification and SDS-PAGE to assess the protein integrity of the extracts. This was followed by toxicity testing using a macrophyte model (*duckweed*, *Lemna aequinoctialis*), with different doses of the fractionated extracts. Subsequently, LC-MS/MS mass spectrometry was conducted to identify the protease inhibitors and perform bioinformatics analyses aimed at investigating the biological activities associated with the identified inhibitors. The results showed that protein integrity was preserved and that protease inhibitors were identified in different fractions, confirming the effectiveness of the fractionation methods and the integrity of the polyacrylamide gel. The toxicity test analysis revealed varying degrees of growth inhibition in duckweed and chlorosis processes in the plant across different extracts, although the dosage responses were similar. The results showed a considerable variety of protease inhibitors present in the fractions, highlighting their importance for future studies. Additionally, the toxicological tests proved effective in identifying protein dosages with lower harmful effects, and may serve as a reference for future toxicity studies.

Keywords: Bioactive compounds; forage palm; biological therapies; Toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Palma forrageira no semiárido brasileiro	18
Figura 2 –	Fruto de palma forrageira, figo-da-Índia em cladódios	19
Figura 3 –	Cladódios de palma forrageira infestados por cochonilha de escamas	25
Figura 4 –	<i>Lemna</i> spp. em água	30
Figura 5 –	Análise de proteínas dos extratos proteicos de palma em gel SDS-PAGE	39
Figura 6 –	Representação dos domínios conservados de inibidores de protease dos fracionamentos	42
Figura 7 –	Representação de correlação dos inibidores de protease em árvore filogenética	42
Figura 8 –	Comparação do teste de toxicidade primeiro dia (dia 0) e ao final do experimento (dia 8)	44
Gráfico 1 –	Gráfico de crescimento relativo de <i>Lemna aequinoctialis</i>	45
Figura 9 –	Comparação dos processos de clorose sofridos por <i>Lemna aequinoctialis</i> em cada tratamento	46
Figura 10 –	Comparação macro e microscópica das <i>Lemnas</i> spp. no tratamento 0-30%	46
Figura 11 –	Comparação macro e microscópica das <i>Lemnas</i> spp. no tratamento 30-60%	47
Figura 12 –	Comparação macro e microscópica das <i>Lemnas</i> spp. no tratamento 0-60%	47
Figura 13 –	Comparação macro e microscópica das <i>Lemnas</i> spp. no tratamento controle	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Domínios conservados similares a inibidores de protease em espécies do gênero <i>Opuntia</i>	37
Tabela 2 –	Concentrações das frações proteicas dos inibidores de protease	38
Tabela 3 –	Caracterização dos inibidores de protease identificados nos cladódios de palma forrageira	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine Serum Albumin
CAM	Metabolismo Ácido das Crassuláceas
CELLO	Subcellular Localization Predictive System
IP	Inibidores de Protease
MDA	Malodialdeído
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PANCs	Plantas Alimentícias Não Convencionais
RGR	Relative Growth Rate
ROS	Reactive Oxygen Species

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Angiospermas da Caatinga.....	17
2.2 Palma forrageira (<i>Opuntia</i> spp.).....	17
2.2.1 Figo-da-Índia.....	19
2.3 Origem e importância da palma forrageira no Brasil.....	20
2.4 Contexto Biotecnológico.....	21
2.5 Cochonilha-de-escamas.....	23
2.6 Resposta fisiológica das plantas à herbivoria.....	25
2.7 Proteases e suas aplicações.....	26
2.8 Inibidores de protease.....	27
2.9 A importância da análise toxicológica de moléculas com potencial aplicabilidades farmacoterapêuticas.....	28
2.10 <i>Lemna aquinoctialis</i>	29
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo principal.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Prospecção in silico de sequências peptídicas contendo domínios específicos correspondentes a lectinas, inibidores de proteases e ribonucleases.....	33
4.2 Obtenção do extrato bruto dos cladódios de <i>Opuntia stricta</i> infestados por cochonilha-de-escamas (<i>Diaspis echinocacti</i>).....	33
4.3 Fracionamento e quantificação do extrato proteico.....	34
4.4 SDS-PAGE e identificação dos inibidores de protease presentes nas diferentes frações proteicas.....	34
4.5 Análise proteômica diferencial das frações proteicas.....	34
4.6 Análises bioinformáticas de genes associados a inibidores de protease presentes no proteoma de <i>Opuntia stricta</i>	35
4.7 Análise de toxicidade em espécie modelo macrófita aquática.....	36
5.1 Prospecção in silico de produtos gênicos associados a inibidores de protease no proteoma presumível da palma forrageira.....	37
5.2 Quantificação e análise das frações proteicas.....	37
5.3 Análise da integridade dos extratos fracionados por Gel SDS-PAGE.....	38
5.4 Identificação e análises bioinformáticas de diferentes inibidores de protease obtidos nas frações proteicas.....	39
5.5 Análise de toxicidade em espécie modelo macrófita aquática.....	43
6 DISCUSSÃO.....	49
6.1 Prospecção in silico de produtos gênicos associados a inibidores de protease no proteoma presumível da palma forrageira.....	49

6.2 Análise da integridade dos extratos fracionados por Gel SDS-PAGE.....	49
6.3 Identificação e caracterização dos inibidores de protease encontrados nos extratos proteicos.....	50
6.4 Avaliação da toxicidade dos extratos fracionados com modelo biológico macrófita aquática (lentilha-d'água).....	52
7 CONCLUSÃO.....	54
7.1 identificação e caracterização dos inibidores de protease presentes nos fracionamentos.....	54
7.2 Análise e avaliação da toxicidade de extratos proteicos enriquecidos com inibidores de protease.....	54
8 REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro, caracterizado por ser uma região semiárida com baixos índices pluviométricos e fauna e flora adaptadas às condições secas e à degradação dos solos, que afetam diretamente a economia regional (Tabarelli et al., 2020). Por essas razões, o sertão pernambucano possui sua economia voltada para cultivos de subsistência e criação de gado, sendo esta última a atividade monetária mais relevante para a região (Araújo et al., 2004). Porém, um grande agravante para a criação animal em regiões secas é a escassez de alimentos e a baixa disponibilidade de água, fazendo com que as populações locais recorram a alimentos de baixo custo e resistentes à seca, sendo a palma forrageira uma opção viável para a alimentação animal e humana na região (Campos, 2017).

A palma forrageira (*Opuntia* spp.) é uma cactácea originária do México, introduzida no Brasil nas regiões do sertão, do Agreste e de Pernambuco (Simões et al., 2005). É uma planta com grande relevância socioeconômica, devido ao seu alto valor nutricional e suas diversas aplicações, tanto na alimentação animal quanto na exploração biotecnológica (Dutra, 2021). Por sua alta capacidade de adaptação a condições de seca e a solos áridos, a palma se tornou um elemento essencial como complemento alimentar do gado, por possuir baixo custo de produção. Essa planta possui cerca de 80% de sua composição convertida em água, além de compostos primários que ajudam na nutrição e no desenvolvimento de animais criados para pecuária (Moura, 2011). A palma é regularmente utilizada como composto terapêutico, devido ao seu acúmulo de compostos bioativos importantes para a saúde e o bem-estar, sendo empregada no tratamento de inflamações, inchaços, entre outras aplicações (Santos, 2013).

A palma pode ser empregada como alternativa complementar à medicina popular devido ao potencial farmacoterapêutico de moléculas oriundas do seu metabolismo primário e secundário, que têm como função proteger a planta e regular a expressão de certas vias metabólicas, mantendo a homeostase frente a situações adversas, seja por estresses abióticos ou bióticos, como a

cochonilha-de-escamas, um dos principais predadores da palma (Aguiar et al., 2019).

A cochonilha-de-escamas (*Diapsis echinocacti* Bouché) é um inseto-praga que afeta, além da palma forrageira, diferentes culturas de interesse comercial, podendo destruir plantações inteiras e causar grandes prejuízos econômicos (Gonçalves et al., 2020). O inseto forma uma carapaça em volta de si e se alimenta da seiva da planta, podendo levar até à queda dos cladódios, que começam a sofrer clorose, sinalizando seu enfraquecimento. A infestação da cochonilha-de-escamas também pode facilitar a entrada de outros fitopatógenos, como vírus, que acabam enfraquecendo ainda mais a planta (Chagas, 2018).

Apesar de possuir o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), a palma forrageira também é prejudicada pelas altas temperaturas e pela baixa pluviosidade do semiárido, o que facilita a predação pela cochonilha-de-escamas, sendo esse mais um contribuinte para a produção de biomoléculas com o intuito de contornar as condições adversas do meio (Carmo, 2019).

Em decorrência dessas situações adversas proporcionadas pelo meio ambiente e por estresses bióticos, a palma forrageira produz uma série de compostos como resposta na tentativa de combater os estresses a que está submetida (Tremacoldi, 2009). Dentre esses compostos, destacam-se os inibidores de protease (IPs), moléculas responsáveis pela regulação das enzimas conhecidas como proteases que, por sua vez, são responsáveis pela clivagem de outras proteínas (Papaneophytou, 2024). Os inibidores impedem a digestão desenfreada de proteínas essenciais para o funcionamento celular, além de controlarem a ativação ou inibição de proteínas que podem apresentar efeitos adversos no sistema fisiológico. Os inibidores de protease estão sendo empregados no contexto biotecnológico por apresentarem uma alternativa segura e sustentável na terapia contra alguns tipos de vírus que dependem estritamente de proteases para manter sua atividade virulenta no hospedeiro (Majerová; Konvalinka, 2022).

Essas biomoléculas podem apresentar compostos tóxicos em determinadas concentrações, o que pode comprometer a saúde do organismo (Nath; Goswami, 2021). Por essa razão, diferentes testes de toxicidade são realizados em novos fármacos e biomoléculas com potencial de aplicabilidade farmacológica, a fim de garantir a viabilidade do uso terapêutico de bioativos sem grandes riscos à saúde

(Turolla; Nascimento, 2006). Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar a toxicidade de frações proteicas enriquecidas com inibidores de protease de *Opuntia stricta* (Haw.), utilizando *Lemna aequinoctialis* como modelo biológico para estudos de toxicidade de moléculas com potenciais aplicações farmacoterapêuticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Angiospermas da Caatinga

As angiospermas da Caatinga apresentam modificações morfoanatômicas, como folhas reduzidas ou transformadas em espinhos, caules suculentos capazes de realizar fotossíntese, e cutículas espessas que minimizam a perda de água. Além disso, exibem adaptações nos sistemas fisiológicos e bioquímicos como forma de conservar água e conferir maior resistência ao clima seco (Silva, 2016).

Trata-se de um bioma com grande diversidade de plantas, tanto nativas quanto exóticas, que produzem uma ampla variedade de metabólitos secundários — como saponinas, alcaloides, terpenoides, entre outros compostos — sintetizados em resposta às condições ambientais adversas (Chaves, 2012).

Muitas dessas plantas da Caatinga são utilizadas como alimento na criação de bovinos leiteiros. Por apresentarem alto valor nutricional, são classificadas como Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs), sendo a *Opuntia* sp. um exemplo notável (Fernandes; Beluce, 2023).

2.2 Palma forrageira (*Opuntia* spp.)

A *Opuntia* spp., conhecida popularmente como palma forrageira, é uma cactácea cultivada e adaptada às regiões semiáridas do Brasil e do mundo, como mostra a **figura 1** (Brasil et al., 2018). Está inserida no contexto evolutivo da família Cactaceae, da ordem Caryophyllales, uma das famílias mais emblemáticas da flora do continente americano, com adaptações especializadas a ambientes áridos e semiáridos. A família Cactaceae possui cerca de 130 gêneros e mais de 2.000 espécies (Reyes-Agüero; Aguirre-Riveira; Hernández, 2005).

O gênero *Opuntia* é monofilético, ou seja, possui um ancestral comum exclusivo entre todas as espécies presentes nesse grupo (Flórez; Albeziano; Violet, 2018). Alguns estudos moleculares sugerem que esse gênero divergiu de outras cactáceas há cerca de 15 milhões de anos, contribuindo para a radiação adaptativa de *Opuntia* spp. nas Américas (Griffith; Porter, 2009).

Em termos de morfoanatomia, a palma apresenta características evolutivas específicas para sua sobrevivência em regiões com elevadas temperaturas e longos períodos de estiagem, como seu crescimento arbustivo, folhas modificadas em espinhos — tanto para proteção contra herbívoros quanto para evitar a perda excessiva de água — e caules transformados em cladódios suculentos, que armazenam água durante as secas prolongadas típicas do sertão nordestino. Além disso, realizam fotossíntese com mínima perda hídrica, função que seria realizada pelas folhas em outras plantas (Teles et al., 2002).

Por possuir o Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM), a palma tem a capacidade de captar a energia solar durante o dia e fixar o dióxido de carbono à noite, adaptação fundamental para evitar a perda de água por evaporação (Ramos, 2022). Essa planta pode atingir alturas que variam de 2 a 4 metros, dependendo das condições ambientais e do manejo (Donato et al., 2014).



Figura 1. Imagem de campo de palma forrageira (*Opuntia spp.*). Fonte: IPA/MG (2021).

2.2.1 Figo-da-Índia

O fruto da palma forrageira, é popularmente conhecido como figo-da-Índia (Guerreiro-Beltrán; Ochoa-Valesco, 2018). Trata-se de um fruto carnoso, comestível e nutritivo, que se desenvolve nas bordas dos cladódios da planta, como mostrado na **figura 2**. Apresenta formato arredondado e cores geralmente vibrantes, como o rosa-avermelhado quando maduro (Alves et al., 2019). Possui uma polpa suculenta e doce, cuja coloração pode variar, sendo predominantemente branca, amarela, rosa ou roxa (Campos, 2016).

É bastante rico em água, açúcares, fibras alimentares, vitamina C e carotenoides. Seu consumo é comum na alimentação humana, especialmente em países como Estados Unidos, México, Itália, China, entre outros, onde é considerado uma iguaria (Dos Santos Nunes, 2011).

Apesar de os frutos serem menos explorados na alimentação do gado, podem ser inseridos na dieta animal como complemento alimentar, por conterem grande quantidade de água. No entanto, são mais comumente destinados à alimentação humana e à fabricação de geléias, doces, fermentados, como o vinho (Lopes; Silva, 2006).



Figura 2. Fruto de palma forrageira, figo-da-Índia presente em cladódios. Fonte: Johncopland (2019).

2.3 Origem e importância da palma forrageira no Brasil

Acredita-se que a origem da palma forrageira foi no México, onde é amplamente utilizada como alimento por populações nativas. Posteriormente, foi introduzida em regiões áridas e semiáridas de outros continentes como planta ornamental (Simões et al., 2005). No Brasil, sua introdução foi mediada pelos portugueses durante o período de colonização das Américas (Nunes, 2011). O potencial forrageiro da palma foi explorado a partir da década de 90, após uma seca severa no final da década de 1980 no semiárido nordestino.

O objetivo inicial do cultivo da palma forrageira no Brasil era servir de alimento para a cochonilha-do-carmim (*Dactylopius coccus*), principal agente na produção de corantes naturais de tonalidade avermelhada, conhecidas como carmim (Vasconcelos et al., 2009). Porém com as recorrentes secas, a planta passou a ser utilizada como alimento complementar a outras forragens na dieta do gado do semiárido, ganhando importância socioeconômica para o semiárido brasileiro (Albuquerque, 2000; Simões et al., 2005).

A palma pode ser oferecida tanto fresca quanto seca, sendo seu aproveitamento bastante versátil. Pode ser usada como suplemento alimentar junto a outras forragens ou até mesmo como base principal da dieta animal durante os períodos de seca (Da Frota et al., 2015). Outro aspecto relevante é sua capacidade de produzir metabólitos secundários, frequentemente associados a propriedades com potencial uso na medicina alternativa (Mesquita et al., 2017).

Sua inclusão na alimentação animal não se deve apenas à sua tolerância à seca, mas também à sua eficiência como alimento para bovinos, sendo uma estratégia eficaz para a produção de leite. Por ser composta majoritariamente por água, é eficiente na hidratação do gado e no enfrentamento dos desafios climáticos característicos de regiões com baixos índices pluviométricos e solos degradados (Novoa, 2014). A palma possui alto valor energético e nutricional, além de ser facilmente digerida, devido ao seu baixo teor de lignina, o que aumenta a digestibilidade pelos animais (Lopes et al., 2019).

Outro fator importante é seu baixo custo de produção. Esta planta requer poucos insumos para o cultivo e pode ser propagada de forma simples, por meio do corte dos próprios cladódios, o que facilita seu manejo (Lima; De Almeida Araújo; De

Melo, 2020). Em algumas regiões da Caatinga, também é introduzida na alimentação humana por populações em situação de vulnerabilidade (Dos Santos; De Souza; Da Silva Ferko, 2023).

A palma forrageira pode ser cultivada com irrigação mínima ou até mesmo sem irrigação, aproveitando as chuvas esparsas para se desenvolver (Júnior et al., 2014). Sua capacidade de produzir forragem mesmo durante longos períodos de estiagem representa um grande benefício para os pecuaristas, que frequentemente enfrentam a perda de pastagens naturais durante a seca (Rocha, 2012).

Trata-se de uma planta que, uma vez estabelecida, não exige cuidados intensivos, tornando-se uma opção atrativa para agricultores familiares e pecuaristas de pequeno e médio porte (De Queiroz et al., 2016). Pode ser cultivada em solos de baixa fertilidade, típicos de regiões semiáridas, o que a torna uma excelente alternativa para áreas com solos degradados (Campos, 2017). Sua capacidade de adaptação é um dos principais fatores para seu uso crescente em sistemas de produção agrícola em regiões áridas e semiáridas do Brasil (Saraiva et al., 2017).

Além disso, a palma forrageira desempenha um papel importante na sustentabilidade dos sistemas agrícolas (Saraiva et al., 2017). Contribui para a conservação da água no solo, melhora a infiltração e reduz o escoamento superficial, ajudando a combater a erosão em áreas suscetíveis (Silva et al., 2014). Seu sistema radicular profundo auxilia na recuperação de solos degradados e na mitigação dos efeitos da desertificação (Mesquita, 2023). Por ser uma planta suculenta com metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), a palma apresenta notável capacidade de fixar o carbono atmosférico, contribuindo para o controle das mudanças climáticas (Israel; Nobel, 1994).

2.4 Contexto Biotecnológico

O potencial biotecnológico da palma forrageira é vasto e vai além da agricultura. Ela tem sido aplicada no melhoramento genético, por meio do uso de biotecnologia molecular para selecionar variedades mais produtivas, com resistência à seca e a pragas. Destaca-se na produção de biomassa e bioenergia, onde seus resíduos podem ser utilizados na geração de biogás, biofertilizantes e

biocombustíveis, além da extração de compostos bioativos para uso nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia (Dutra, 2021).

A palma forrageira tem despertado crescente interesse da comunidade científica devido ao seu potencial farmacológico (Pinto; Farias; Da Costa, 2019). Seus componentes bioativos demonstram propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, hipoglicemiantes, hipolipemiantes, entre outras, o que a torna uma fonte promissora de compostos terapêuticos naturais (Silva, 2015). Diversos compostos bioativos já foram identificados na palma, contribuindo para suas propriedades medicinais (De Azevedo, 2017). Entre eles, destacam-se as betalaínas, como a betanina e a isobetanina — pigmentos naturais que conferem coloração ao fruto da palma, o figo-da-Índia (Campos, 2016). Essas moléculas têm sido associadas a benefícios medicinais, como o auxílio no tratamento de queimaduras e inflamações, além de promoverem a saúde digestiva por meio de suas fibras alimentares (Farias, 2016).

A palma também é rica em vitaminas A, C e E, polifenóis (compostos vegetais com múltiplos grupos fenólicos), carotenoides (pigmentos lipossolúveis responsáveis pelas colorações alaranjadas em vegetais), além de minerais como cálcio, magnésio e potássio, e aminoácidos essenciais que conferem à planta propriedades antimicrobianas (Silva, 2005). Esses compostos são encontrados majoritariamente nos cladódios da planta (Campos, 2016).

Extratos de *Opuntia* spp. apresentam alta capacidade de neutralização de radicais livres, devido à presença de compostos fenólicos e flavonoides. Essa atividade antioxidante tem sido associada à proteção contra doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e cancerígenas (Castañeda-Arriaga et al., 2021).

Diversos estudos apontam para a capacidade da palma forrageira de reduzir os níveis de glicose no sangue, sendo eficaz no controle do diabetes tipo II. Essa ação parece estar relacionada à presença de fibras e mucilagens, que retardam a absorção de carboidratos, além dos flavonoides, que modulam a sensibilidade à insulina (Necchi et al., 2016).

O consumo da palma também tem sido associado à redução dos níveis de colesterol total, LDL (conhecido como “colesterol ruim”) e triglicerídeos. Além disso, demonstrou alta capacidade de eliminar toxinas provenientes do álcool e do tabaco,

devido ao seu conteúdo de fibras e antioxidantes que auxiliam na regulação do metabolismo lipídico (Dos Santos Nunes, 2011).

Extratos da palma demonstraram reduzir a produção de citocinas inflamatórias em modelos experimentais, sugerindo potencial uso no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como a artrite (Wu; Liu; Ng, 2008). Estudos preliminares indicam que a aplicação de gel de palma pode acelerar o processo de cicatrização de feridas e apresentar atividade antimicrobiana contra bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, provavelmente devido à presença de compostos fenólicos e mucilagens com ação de barreira (Silva, 2015).

Alguns estudos com extrato de palma forrageira também apontaram redução do estresse e da ansiedade em modelos biológicos com ratos idosos (Moura et al., 2023). Os flavonoides presentes na planta têm importante atividade antioxidante, combatendo radicais livres e prevenindo danos celulares, o que pode retardar processos degenerativos e o envelhecimento precoce (Santos, 2013). Já as mucilagens atuam como fibras solúveis, com efeitos benéficos sobre a glicemia e os níveis de colesterol (Dos Santos Nunes, 2011).

O potencial farmacológico da palma forrageira aponta para diversas aplicações na fitoterapia e no desenvolvimento de fitofármacos. Suplementos alimentares à base de *Opuntia* já são comercializados em alguns países, com alegações relacionadas ao controle glicêmico e ao emagrecimento (Gómez-García et al., 2024). Além disso, seu uso em formulações cosméticas naturais, devido à ação hidratante e antioxidante, está em crescente expansão (Damasceno et al., 2016).

2.5 Cochonilha-de-escamas

A cochonilha-de-escamas (*Diaspis echinocacti*) pertence à superfamília Coccoidea, dentro da ordem Hemiptera, sendo amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais (Gullan; Cook, 2007). Esses insetos são conhecidos por seu pequeno tamanho e pela presença de escamas protetoras. Atacam uma grande variedade de plantas, desde ornamentais até frutíferas e culturas comerciais. É uma praga comum em diversas culturas devido à sua alta adaptação a climas quentes e à elevada incidência de radiação solar (Martins et al., 2015).

A cochonilha-de-escamas envolve-se com uma carapaça cerosa e fixa-se nos cladódios da palma, sugando os nutrientes da planta (Miller; Kosztarab, 1979). Esses insetos se alimentam da seiva, enfraquecendo a planta e levando à desidratação e à posterior morte dos tecidos (Carmo, 2019). Apresentam dimorfismo sexual acentuado: as fêmeas adultas, geralmente imóveis, permanecem fixas nas plantas, cobertas por uma escama cerosa que as protege contra predadores e defensivos agrícolas; já os machos possuem asas e vivem por um curto período, apenas o suficiente para a reprodução (Tian et al., 2018).

Os ovos eclodem sob a proteção da escama da fêmea, liberando larvas que se espalham pela planta em busca de locais adequados para se fixarem e iniciarem a sucção da seiva (Gullan; Kosztarab, 1997). A cochonilha-de-escamas também pode ser responsável pela redução da fotossíntese, pois, ao se fixar principalmente em folhas e caules, pode bloquear a luz solar ou causar necroses, diminuindo a capacidade fotossintética da planta (Das Chagas, 2018). Seu ciclo de vida varia conforme a espécie e as condições ambientais, mas, geralmente, é rápido, com várias gerações por ano em climas quentes. Isso favorece infestações persistentes e de difícil controle (Gullan; Kosztarab, 1997).

A cochonilha-de-escamas possui uma ampla gama de hospedeiros, incluindo plantas cítricas, cafeeiro, coqueiro, palmeiras, hibisco, mangueira, jabuticabeira e também a palma forrageira. A diversidade de plantas afetadas torna o controle ainda mais desafiador (Godoy; Amorim; Bergamin, 2001).

Na palma, a cochonilha fixa-se nos cladódios, sugando a seiva e levando ao amarelamento e à morte da planta (Sena et al., 2021). Isso reduz o crescimento e a capacidade de brotamento, comprometendo a produtividade dos agricultores (Aguilar et al., 2019). As áreas infestadas apresentam manchas amareladas ou esbranquiçadas ao redor dos insetos. Pode haver deformação dos cladódios e ressecamento das bordas (Sena et al., 2021). A planta atacada perde vigor, e sua composição nutritiva piora, afetando a alimentação animal (Carmo, 2019).

O inseto causa grandes prejuízos econômicos, considerando a redução da produtividade, a queda na qualidade dos frutos e o aumento dos custos com controle e manejo da praga (Santos et al., 2010). A palma é uma das forrageiras mais acessíveis e disponíveis em regiões secas, portanto, quando a produção é afetada,

os produtores precisam recorrer à compra de ração, feno ou milho, que são muito mais caros, elevando também o custo da carne e do leite (Dos Santos Nunes, 2011).

Durante surtos severos da praga, como os registrados na Paraíba e em Pernambuco, muitos produtores perderam mais de 80% de suas plantações de palma. Em alguns casos, os prejuízos ultrapassaram milhões de reais por município, com impactos sociais relevantes, como o êxodo rural e o aumento da pobreza (Aguiar et al., 2019). A **figura 3** evidencia a presença de cochonilha-de-escamas nos cladódios de palma forrageira.



Figura 3. Imagem de campo de cochonilha-de-escamas nos cladódios de palma forrageira. Fonte: Senar/SE (2020).

2.6 Resposta fisiológica das plantas à herbivoria

As plantas enfrentam diversos estresses bióticos, causados por organismos vivos, como insetos, fungos, bactérias, vírus, nematoides e ervas daninhas. Para sobreviver e manter seu desenvolvimento, elas desenvolveram mecanismos

complexos de defesa (Fernandes et al., 2009). As plantas não possuem sistema imunológico como os animais, mas apresentam estratégias de defesa físicas, químicas e moleculares (Kaur et al., 2022).

As defesas físicas consistem em barreiras externas à entrada de patógenos ou herbívoros, como cutículas espessas, tricomas, espinhos, células lignificadas, entre outras (Barros; Soares, 2013). As defesas químicas incluem a produção de compostos tóxicos ou inibidores, como taninos, alcaloides, terpenoides, flavonoides, entre outros (Oliveira et al., 2006).

Também pode haver a ativação de genes de defesa, como os que codificam proteínas relacionadas a patógenos, além da produção de enzimas capazes de degradar as paredes celulares dos patógenos, quando presentes (Kaur et al., 2022). Em alguns casos, ocorrem respostas de defesa baseadas na morte celular programada (Mariano et al., 2022). Entre essas estratégias, destacam-se os inibidores de protease, que já foram amplamente descritos na literatura científica.

Estudos proteômicos indicam que, sob ataque da cochonilha-de-escamas, a palma forrageira ativa vias de defesa associadas ao ácido jasmônico, além de processos de reconhecimento de elicitores (moléculas que ativam as defesas naturais das plantas) e a eliminação de espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species – ROS) (Moura et al., 2023). Contudo, a combinação desse ataque com o déficit hídrico compromete essas respostas, sugerindo que a planta, sob estresse hídrico, apresenta menor capacidade de defesa contra a praga (Carmo, 2019).

2.7 Proteases e suas aplicações

As proteases, ou peptidases, são enzimas responsáveis pela clivagem de proteínas em fragmentos menores, como peptídeos ou aminoácidos (Vermelho et al., 2008). Esse processo pode ocorrer por várias razões, como a digestão e absorção de nutrientes, pois as proteínas alimentares são grandes e não conseguem ser absorvidas pelo intestino (Oliveira et al., 2017). Outro motivo é a ativação de proteínas, já que muitas são produzidas em estado inativo e precisam ser clivadas para desempenharem suas funções, evitando que causem danos em

locais inadequados (Oliveira, 2023). Além disso, as proteases atuam na regulação de processos celulares, onde a clivagem da proteína pode ativar ou desativar funções na célula, regulando crescimento, inflamação e até apoptose celular (Buono; Hudecek; Nowack, 2019). Também participam da resposta imune, em que algumas proteases clivam proteínas para apresentar antígenos (fragmentos) ao sistema imunológico (Cryns; Yuan, 1998). As proteases ainda são importantes na reciclagem e eliminação de proteínas, quebrando proteínas defeituosas, mal formadas ou envelhecidas, para que os aminoácidos possam ser reutilizados ou eliminados, mantendo a saúde celular (Ann; Sommer; Wolf, 2014).

As proteases presentes em vegetais também degradam proteínas de animais e microrganismos (Troncoso; Sánchez; Ferreira, 2022). Elas desempenham funções essenciais para o crescimento, defesa e adaptação das plantas (Tremacoldi, 2009). Além disso, possuem diversas aplicações na indústria e na medicina, como no amaciamento de carnes, produção de cosméticos, clareamento de cerveja e tratamento de tecidos na indústria têxtil (Martim et al., 2017). Durante a germinação, degradam proteínas de reserva em sementes para fornecer aminoácidos ao embrião (Shen et al., 2018). Também podem quebrar proteínas de microrganismos ou insetos, dificultando infecções ou a digestão do tecido vegetal. Atuam na adaptação a condições adversas, como seca, salinidade e ataque de herbívoros (Resende et al., 2007).

2.8 Inibidores de protease

Os inibidores de proteases (IPs) são moléculas que têm a capacidade de inibir a atividade das proteases (Tremacoldi, 2009). Os inibidores são fundamentais para manter o equilíbrio no organismo, prevenindo a degradação excessiva ou descontrolada de proteínas (Hartl et al., 2011). Eles podem impedir que as proteases digestivas, inflamatórias ou de defesa destruam proteínas saudáveis do corpo (De Assis et al., 2017). Já são estudados em terapias antivirais e em pesquisas sobre câncer e doenças degenerativas, nas quais desequilíbrios entre proteases e inibidores podem estar envolvidos (Kuehnemann et al., 2023).

Os inibidores de protease vegetais estão sendo estudados para aplicações biotecnológicas voltadas à saúde e ao bem-estar humanos. Alguns inibidores

provenientes de plantas vêm sendo descritos por possuírem potencial em atividades contra uma variedade de vírus, incluindo vírus humanos como o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), influenza, SARS-CoV-2, entre outros (Noske, 2023). Na palma forrageira, esses inibidores de protease estão associados ao papel de proteção da planta contra estresses bióticos, como a predação pela cochonilha-de-escamas. Quando a planta está sob ataque desse inseto, a expressão genética associada aos inibidores de protease aumenta como resposta de defesa da planta, tornando as proteínas e peptídeos presentes na palma forrageira mais difíceis de serem consumidos pela cochonilha-de-escamas (Bezerra et al., 2018).

2.9 A importância da análise toxicológica de moléculas com potencial aplicabilidades farmacoterapêuticas

Os testes pré-clínicos realizados em novos fármacos são uma abordagem essencial para avaliar a segurança e eficácia do potencial medicamento que será implementado como estratégia terapêutica, reduzindo riscos e aumentando as chances de sucesso medicinal. As análises toxicológicas são efetuadas no momento da triagem do fármaco, em que diferentes testes são realizados em variadas concentrações e modelos biológicos (Dupla, 2023). A análise identifica efeitos danosos potenciais que uma molécula, ou conjunto de moléculas, pode causar, como uma reação imediata ao fármaco ou crônica, após uma exposição prolongada (Parasuraman, 2011).

Vale ressaltar que medicamentos de caráter químico normalmente não possuem especificidade para a área a ser tratada, tendo efeito em todo o sistema funcional do paciente, podendo comprometer órgãos vitais, como rins, fígado, coração, entre outros (Rodrigues; Oliveira, 2016). Podem apresentar efeito genotóxico, mutagênico ou até cancerígeno. Dessa forma, a busca por compostos biológicos para implementação terapêutica é relevante não só por ser uma forma mais sustentável para o meio ambiente, mas também porque moléculas com potencial bioativo são estudadas por suas especificidades no organismo, tornando a terapia mais segura e aumentando seu potencial de sucesso (Naithani et al., 2021).

Conhecer o perfil toxicológico de uma determinada substância desde os estágios iniciais pode favorecer a pesquisa para eliminação do composto nocivo ou para buscar sua neutralização (Souza; Da Silva; Araújo, 2022). Além de todas as questões relacionadas à saúde pessoal do paciente, questões ecológicas também devem ser levadas em consideração, pois, por meio da excreta do indivíduo, os medicamentos podem afetar o meio ambiente, gerando impactos sociais (Souza; Aquino; Silva, 2020).

2.10 *Lemna aequinoctialis*

Lemna spp., também conhecida como lentilha-d'água, é uma pequena angiosperma aquática da família Araceae e subfamília Lemnoideae como evidencia a **figura 4** (Pott; Cervi, 1999). É uma planta muito utilizada na piscicultura e pecuária como ração, devido ao seu alto valor proteico e nutricional (Pereira et al., 2022). A lentilha-d'água também apresenta propriedades de absorção de substâncias tóxicas presentes na água, incluindo metais pesados (Pott; Pott, 2002). Por essas razões, a lentilha-d'água é uma macrófita estudada com potencial em biorremediação de lagos e córregos contaminados por substâncias tóxicas, servindo também como marcador biológico de áreas contaminadas (Pio; Souza; Santana, 2013).

Por possuir ciclo de vida curto e crescimento e reprodução rápidos, a lentilha-d'água torna os testes de toxicidade mais rápidos e fáceis de serem analisados, além de ser de fácil manutenção em laboratório. É uma planta com alta sensibilidade a contaminantes no meio, podendo ser facilmente padronizada para experimentos laboratoriais, detectando a qualidade da água e contribuindo para o equilíbrio ecológico dos ecossistemas aquáticos (Pio; Souza; Santana, 2013).

Embora tradicionalmente utilizada como bioindicador em testes de toxicidade aguda e crônica, *Lemna* spp. também tem se mostrado eficaz em estudos que avaliam os efeitos genotóxicos de substâncias químicas (Souza, 2008). Entre os mecanismos analisados, destaca-se a peroxidação lipídica, um processo desencadeado pela ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que pode ser quantificado por meio da determinação dos níveis de malondialdeído (MDA), um subproduto da degradação oxidativa dos lipídios das membranas celulares. A

sensibilidade da lentilha-d'água a esses processos é potencializada por sua baixa variabilidade genética, resultado de sua reprodução predominantemente assexuada, o que favorece a padronização dos ensaios toxicológicos e reduz a ocorrência de frondes com resistência natural aos contaminantes testados (Martins, 2013).

O ensaio cometa (ou comet assay) também tem sido empregado em *Lemna* spp. para detectar quebras no DNA de células individuais. Nesse método, as células são incorporadas em gel de agarose, submetidas à lise e eletroforese, e os fragmentos de DNA migrados formam uma imagem semelhante a um cometa, cuja cauda indica o grau de dano genético (Radić et al., 2011).



Figura 4. Lentilhas-d'água (*Lemna* spp). Fonte: Wikipédia (2008).

O Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas (LGPP), trabalha desenvolvendo pesquisas com a finalidade de identificar peptídeos e proteínas com aplicações biotecnológicas originárias de espécies vegetais nativas e introduzidas no semiárido brasileiro. Nesse contexto, a palma forrageira surge como fonte promissora de moléculas bioativas com potenciais propriedades biotecnológicas,

tendo destaque os inibidores de protease. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade de frações proteicas enriquecidas com inibidores de protease de *Opuntia stricta* (Haw.), utilizando *Lemna aequinoctialis* como modelo alternativo para estudos de toxicidade de moléculas com potenciais aplicações biotecnológicas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Avaliar a toxicidade dos extratos enriquecidos com inibidores de protease presentes nos cladódios de palma-forrageira (*Opuntia stricta* Haw.) infestada por cochonilha-de-escamas (*Diapsis echinocacti* Bouché.)

3.2 Objetivos específicos

- Identificar e caracterizar os inibidores de protease presentes em diferentes frações proteicas obtidas dos cladódios de *O. stricta* (Haw.);
- Avaliar a toxicidade das frações proteicas, e seus inibidores de protease associados, utilizando como modelo alternativo a macrófita aquática *Lemna aequinoctialis*;
- Correlacionar o nível de toxicidade das frações proteicas com os respectivos inibidores de proteases diferencialmente identificados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Prospeção *in silico* de sequências peptídicas contendo domínios específicos correspondentes a lectinas, inibidores de proteases e ribonucleases

Foram utilizados proteomas teóricos oriundos do transcriptoma das espécies *Opuntia ficus-indica*, *Opuntia streptacantha* e *Opuntia cochenillifera* disponibilizados em bancos de dados de acesso público (Uniprot) e fechado (disponibilizado em colaboração com grupo de pesquisa coordenado pelo Dr. John Cushmann, da Universidade de Nevada/Reno, NV, EUA) para seleção das sequências peptídicas contendo domínios específicos correspondentes a inibidores de protease. Após a triagem inicial, as sequências alvo identificadas foram validadas quanto ao seu domínio específico com o auxílio da ferramenta Conserved Domain Database (CD-Search), disponibilizada no National Center for Biotechnology Information — NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), utilizando os seguintes parâmetros: *search Against Database*: Pfam; *E-value threshold*: 0,005; *low-complexity filter*: No; *Composition based statistics adjustment*: Yes. As sequências peptídicas validadas foram organizadas, para cada classe proteica, em subgrupos de acordo com os diferentes domínios conservados identificados.

4.2 Obtenção do extrato bruto dos cladódios de *Opuntia stricta* infestados por cochonilha-de-escamas (*Diaspis echinocacti*)

Os inibidores de protease foram obtidos dos cladódios de *Opuntia stricta* clone IPA200016 (orelha de elefante mexicana) a partir do protocolo descrito por Castilho et al., (2009). Aproximadamente 25 g dos cladódios com maior nível de infestação foram coletados e triturados, com auxílio de um mixer, em 100 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 M - pH 7,0. O extrato bruto obtido foi mantido em agitação orbital a 150 rpm por 30 minutos, filtrado em gaze e subsequentemente centrifugado a 7.500 xg para remoção de restos teciduais (clarificação). O extrato clarificado foi aquecido em banho maria a 70°C e centrifugado como descrito acima para remoção da mucilagem.

4.3 Fracionamento e quantificação do extrato proteico

As proteínas solúveis totais do extrato bruto foram precipitadas/fracionadas por sulfato de amônio nas concentrações de 0-30%, 30-60% e 0-60% (m/v) com auxílio do agitador magnético. Após a adição do sulfato de amônio, as soluções em diferentes fracionamentos foram mantidas no freezer por 15 minutos a 4°C. Depois da obtenção das proteínas em diferentes frações, foi realizada uma diálise com membrana de celulose com cutoff < 3 KDa nos extratos para purificação das amostras e preparação para a quantificação. As frações proteicas foram quantificadas pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) para construção da curva padrão e determinação das concentrações das proteínas.

4.4 SDS-PAGE e identificação dos inibidores de protease presentes nas diferentes frações proteicas

A integridade e perfil de distribuição das proteínas presentes nas frações proteicas (0-30%, 30-60%, 0-60%) foram analisadas via SDS-PAGE em gel de poli(acrilamida) 12,5% de acordo com metodologia descrita por Laemmli (1975), com adaptações.

4.5 Análise proteômica diferencial das frações proteicas

Proteínas (100 µg) dos extratos foram desnaturadas com ureia 8 M, reduzidas com DTT e alquiladas com iodoacetamida. Após diluição com tampão de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 50 mM, foram digeridas com tripsina (1:20, m/m) a 37 °C por 18 h. Os peptídeos tripticos foram centrifugados, concentrados e ressuspensos em H_2O Milli-Q com 0,1% ácido fórmico para análise em LC-MS/MS. A separação foi realizada em sistema UPLC M-Class acoplado a espectrômetro de massas Q-ToF Synapt XS, operando no modo UDMSE e ionização positiva. A identificação proteica foi feita com o software Progenesis QI v4.7 usando banco de dados Opuntia (Uniprot), considerando carbamidometilação (Cys) como modificação fixa e oxidação (Met) como variável. A quantificação

relativa seguiu o método Hi3 (label-free), com FDR de 1% e critérios mínimos de dois peptídeos únicos e cinco fragmentos por proteína.

4.6 Análises bioinformáticas de genes associados a inibidores de protease presentes no proteoma de *Opuntia stricta*

Utilizou-se o banco de dados Uniprot (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7C9AE02/entry>) para identificar as IPs presentes no proteoma de *Opuntia* referentes aos distintos fracionamentos. Foi realizado um alinhamento das sequências dos inibidores de protease identificados nas frações por meio da ferramenta BLASTp, utilizando os parâmetros padrões, limitando o alinhamento apenas ao Reino Plantae (viridiplantae taxid:33090), com o objetivo de identificar sequências homólogas. As sequências resultantes foram analisadas para determinação de suas funções moleculares e para a obtenção de informações sobre proteínas ortólogas aos inibidores de protease (IPs) identificados em *Opuntia*. A localização subcelular das proteínas foi predita utilizando a ferramenta bioinformática CELLO (Subcellular Localization Predictive System) (<https://cello.life.nctu.edu.tw>). O peso molecular das proteínas foi estimado por meio da ferramenta ProtParam. Foi feito mapeamento e identificação dos domínios conservados presentes nos inibidores de protease identificados, através da Batch CD-Search, utilizando os parâmetros: *search Against Database*: Pfam; *E-value threshold*: 0,005; *low-complexity filter*: No; *Composition based statistics adjustment*: Yes. Em seguida foi criada a árvore filogenética correlacionando os inibidores de protease entre eles, com auxílio do Uniprot.

4.7 Análise de toxicidade em espécie modelo macrófita aquática

A toxicidade das frações proteicas (0-30%, 30-60%, 0-60%) foi avaliada *in vivo*, utilizando como modelo biológico a macrófita aquática *Lemna aequinoctialis* (lentilhas-d'água). As frações foram adicionadas em diferentes volumes crescentes de extrato (50, 100, 200 e 400 µL) em microplaca de 24 poços, SH 0.5X (Schenk and Hildebrandt, Merck) e 4 frondes de *L. aequinoctialis* em cada poço. O controle

do ensaio de toxicidade foi realizado com o cultivo das lentilhas-d'água apenas no meio SH 0.5X. A placa foi incubada por 7 dias em sala de cultivo com condições controladas de temperatura (23°C), luminosidade (200 lumens) e fotoperíodo (16 h). A toxicidade das frações foi analisada qualitativamente através dos registros visuais das frondes, e quantitativamente com base na taxa de crescimento das lentilhas-d'água.

Os dados referentes às taxas de crescimento relativo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando o software GraphPad Prism 9.

5 RESULTADOS

5.1 Prospecção *in silico* de produtos gênicos associados a inibidores de protease no proteoma presumível da palma forrageira

A fim de caracterizar-se o conjunto de produtos gênicos associados aos inibidores de protease (IPs) do gênero *Opuntia*, e que podem estar associados a possíveis aplicações biotecnológicas, os proteomas putativos de *Opuntia ficus-indica*, *Opuntia cochenillifera* e *Opuntia streptacantha* foram analisados e as sequências de proteínas identificadas contendo domínios similares, foram agrupadas de acordo com as especificidades dos seus domínios catalíticos. Foram identificadas 44 sequências de proteínas contendo domínios associados a inibidores de protease, dentre os quais, a maior prevalência era de inibidores de serino protease (20 seq.), seguido pelos inibidores de cisteíno protease (10 seq.) e inibidores de tripsina (14 seq.), como pode ser observado na **tabela 1**.

Tabela 1. Número de sequências de proteínas associadas a inibidores de protease no proteoma predito das espécies de *O. cochenillifera*, *O. ficus-indica*, *O. streptacantha*.

Domínios similares a inibidores de protease	<i>O. cochenillifera</i>	<i>O. ficus-indica</i>	<i>O. streptacantha</i>	Total
Inibidor de serino protease	1	1	18	20
Inibidor de cisteíno protease	3	3	4	10
Inibidor de tripsina	6	7	1	14
Total	10	11	23	44

Fonte: A autora (2024).

5.2 Quantificação e análise das frações proteicas

A precipitação das proteínas em diferentes concentrações (0-30%, 30-60%, 0-60%), revelou conjuntos proteicos distintos que variam em relação a sua hidrofobicidade. A quantificação realizada por espectrofotômetro permitiu verificar a

concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) dos fracionados proteicos obtidos dos cladódios de *O. stricta* clone IPA 200016. O método de extração mostrou-se eficiente, possibilitando obter distintas frações proteicas que podem conter inibidores de proteases com potenciais aplicabilidade biotecnológicas (**tabela 2**).

Tabela 2. Concentração das frações protéicas obtidas dos cladódios *O. stricta* clone IPA200016 (orelha de elefante).

Fração proteica - precipitação por sulfato de amônio (m:v)	Concentração proteica ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
0-30%	0,91
30-60%	1,85
0-60%	0,54

Fonte: A autora (2024).

5.3 Análise da integridade dos extratos fracionados por Gel SDS-PAGE

A análise do gel SDS-PAGE 12,5% possibilitou verificar a integridade e o perfil de migração das proteínas precipitadas diferencialmente por sulfato de amônio como apresentado na **figura 5**. É possível observar os distintos padrões de migração das proteínas precipitadas em cada frações, com a 0 - 30% apresentando proteínas em intervalos de peso molecular que variam entre 66 a 14 KDa, enquanto a fração 30 - 60% apresenta a presença de proteínas em intervalos de peso molecular menor, variando entre ~ 30 KDa até 14 KDa. Também é importante destacar que esse perfil de migração está associado a hidrofobicidade das proteínas, onde a fração com menor concentração de sulfato de amônio (0-30%) apresenta proteínas mais hidrofílicas, enquanto a fração com maior concentração (30-60%) apresenta proteínas mais hidrofóbicas.

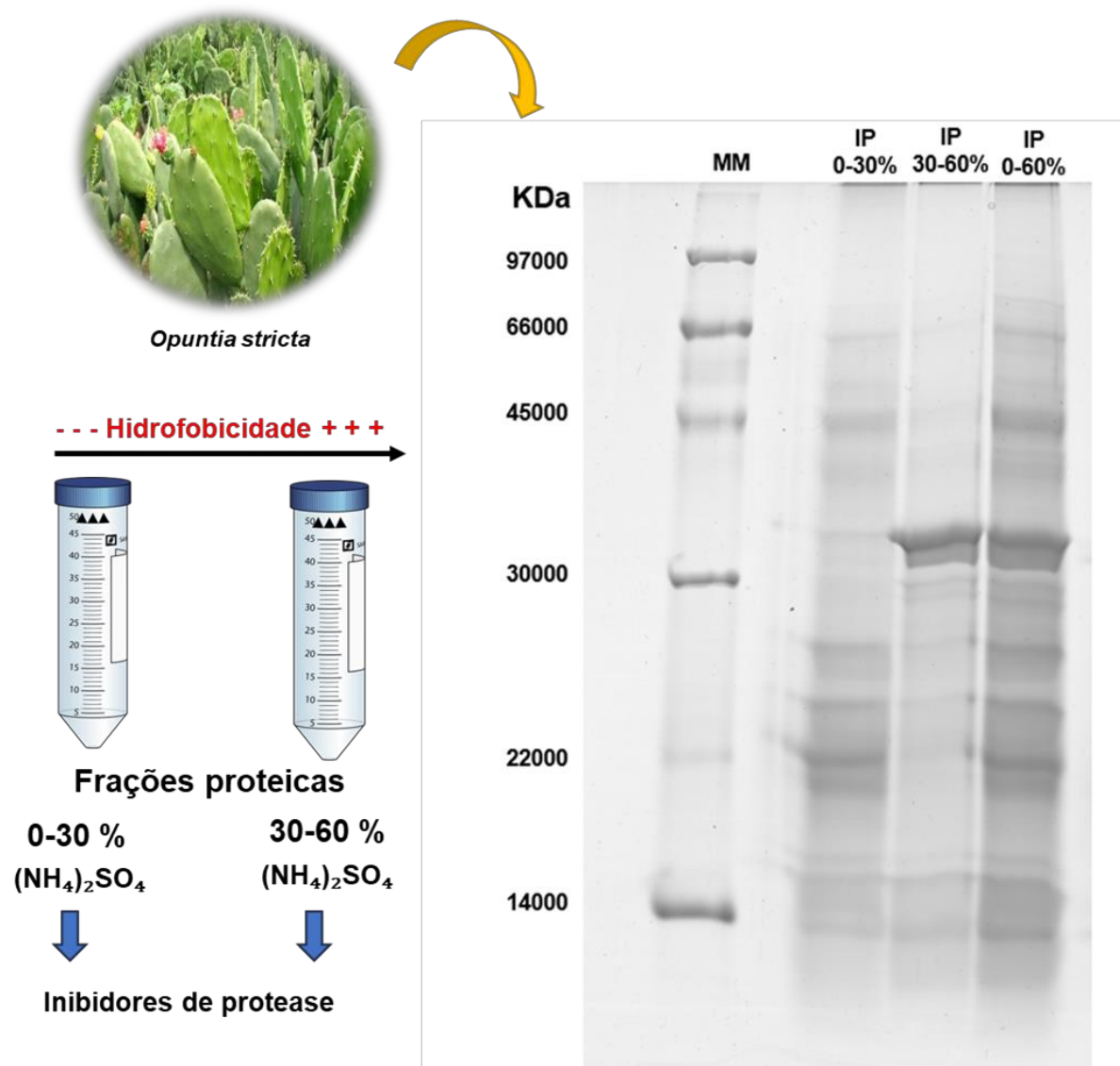


Figura 5. Perfil eletroforético SDS-PAGE das frações proteicas obtidas dos cladódios de *O. stricta* clone IPA200016. Onde: **MM**: marcador molecular; **IP 0-30%**: fração proteica 0-30%; **IP 30-60%**: fração 30-60% e **IP 0-60%**: fração proteica 0-60%. Fonte: A autora (2024).

5.4 Identificação e análises bioinformáticas de diferentes inibidores de protease obtidos nas frações proteicas

A análise proteômica diferencial revelou a presença de sete inibidores de protease (IPs) entre as frações proteicas avaliadas: foram identificados quatro tipos de IPs presentes na fração 0-30% e três na fração 30-60%. A fração 0-60% apresentou os mesmos inibidores contidos nas frações anteriores. Os sete inibidores de protease identificados estão relacionados com a inibição de endopeptidases e

duas especificamente com a inibição de cisteíno-protease, essas últimas contidas apenas na fração 30-60% e 0-60%.

Inicialmente, as sequências obtidas foram consultadas no banco de dados UniProt, que forneceu informações básicas sobre descrição, número de acesso e anotações existentes. Embora a maior parte das IPs esteja descrita em banco de dados público como “não caracterizada”, pôde-se inferir suas funções moleculares relacionadas à inibição da clivagem de ligações peptídicas. O BLASTp realizado comparou as sequências obtidas com o banco de dados de proteínas ortólogas e observou similaridade com proteínas relacionadas à atividade de inibição de proteases já descritas em literatura como relevantes, inclusive para a terapia, o que permitiu inferir funções prováveis mesmo quando a anotação no UniProt era limitada.

Os resultados obtidos pelo CD-Search confirmaram a natureza inibitória das proteínas a partir dos domínios conservados identificados nas IPs obtidas por espectrometria, pois as funções proteicas são definidas principalmente pela estrutura de seus domínios ativos, e não apenas pela sequência completa. A predição de localização subcelular realizada pela ferramenta CELLO indicou a presença desses inibidores em diferentes compartimentos celulares, o que é relevante para correlacionar a localização com possíveis funções fisiológicas, como defesa contra patógenos ou regulação de proteases relacionadas à fotossíntese e ao estresse oxidativo. A análise do peso molecular pelo ProtParam revelou variação entre as IPs, contribuindo para a comparação com os resultados obtidos por SDS-PAGE e para a avaliação da estabilidade proteica. Por fim, ferramentas de análise de alinhamento e agrupamento de sequências (Cluster) permitiram identificar relações evolutivas entre as IPs, evidenciando grupos estruturais conservados, como proteínas do tipo “seed” de 21 kDa e proteínas *miraculin-like*. Esse agrupamento sugere padrões evolutivos e possíveis especializações funcionais. De forma integrada, o uso dessas ferramentas bioinformáticas possibilitou a caracterização detalhada dos IPs identificados, relacionando informações de sequência, estrutura, função e localização subcelular, como mostrado na **tabela 3**.

Tabela 3. Dados referentes aos inibidores de protease identificados nos extratos proteicos, destacando as principais informações de funcionamento e correlação com proteínas de outras plantas.

Acesso (Uniprot)	Descrição Proteica	Proteínas Ortólogas (Blast)	(GO) Função Molecular	Peso Molecular (Da)	Localização Subcelular
A0A7C8YXI0 (1)	Não caracterizada (<i>O. streptacantha</i>)	21 kDa seed protein-like [<i>Spinacia oleracea</i>]	Atividade de inibição endopeptidase	23953,09	Extracelular
A0A7C9AE02 (2)	Não caracterizada (<i>O. streptacantha</i>)	21 kDa seed protein-like [<i>Spinacia oleracea</i>]	—	1113,78	Membrana plasmática
A0A7C8ZY03 (3)	Não caracterizada (<i>O. streptacantha</i>)	miraculin [<i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>]	Atividade de inibição endopeptidase	15378,16	Cloroplasto
A0A7C9DYZ4 (4)	Não caracterizada (<i>O. streptacantha</i>)	21 kDa seed protein-like [<i>Spinacia oleracea</i>]	Atividade de inibição endopeptidase	14582,41	Citoplasma
A0A7C8YBX2 (5)	Não caracterizada (<i>O. streptacantha</i>)	21 kDa seed protein-like [<i>Spinacia oleracea</i>]	Atividade de inibição endopeptidase	23627,38	Extracelular
A0A7C8Z1B0 (6)	Inibidor de cisteína protease (<i>O. streptacantha</i>)	miraculin-like [<i>Chenopodium quinoa</i>]	Atividade inibitória da endopeptidase semelhante à cisteína	11373,87	Citoplasma e cloroplasto
A0A7C9DV95 (7)	Inibidor de cisteína protease (<i>O. streptacantha</i>)	miraculin-like [<i>Chenopodium quinoa</i>]	Atividade inibitória da endopeptidase semelhante à cisteína	12963,90	Mitocôndria

Fonte: A autora (2025).

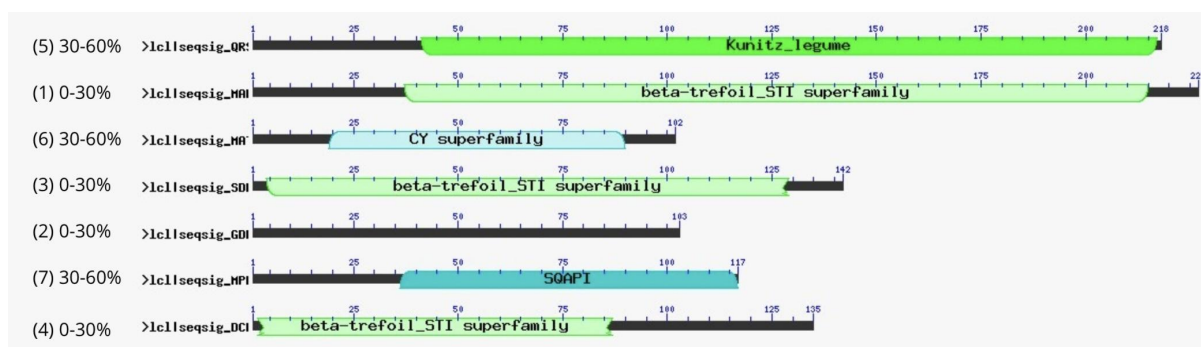


Figura 6. Análise de domínios conservados nos diferentes fracionamentos associados à IPs. Evidencia-se superfamílias como beta-trefoil_TSI e CY superfamily, e regiões de domínios específicos como Kunitz_legume e SQAPI. Fonte: A autora (2025).

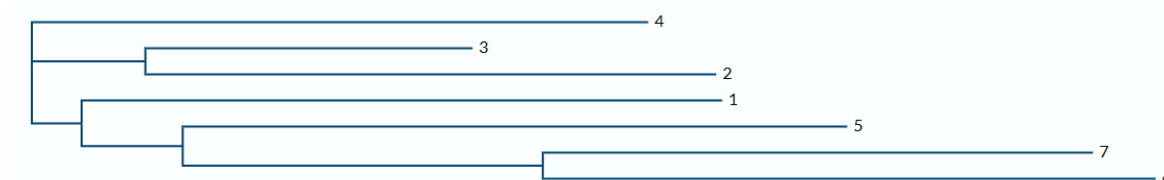


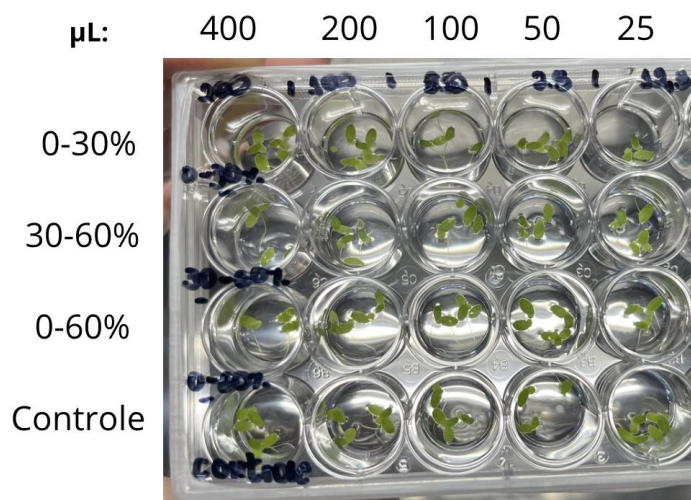
Figura 7. Árvore filogenética relacionado a similaridade entre sequências dos diferentes inibidores de protease enumerados de acordo com a numeração da **tabela 3**. Buscou-se correlacionar as IPs entre elas e a presença dos domínios específicos na **figura 6**. Fonte: A autora (2025).

Os domínios conservados identificados nas sequências proteicas apresentadas na Figura 6 foram classificados como pertencentes a superfamílias de inibidores de protease. Ao relacionar a **figura 6** com a **figura 7**, observou-se que os inibidores de protease (IPs) pertencentes a uma mesma fração estão inseridos na mesma superfamília e apresentam maior similaridade entre si do que com os IPs de outras frações. Dessa forma, as IPs 6 e 7 possuem domínios conservados relacionados à superfamília **CY**, associada à atividade inibitória de cisteíno-proteases. Especificamente, a IP 7 apresentou um *hit* para **SQAPI** (*Squash Aspartic Protease Inhibitor*), que está relacionada à inibição de proteases ácidas. A IP 5, por sua vez, foi a única entre as sete proteínas a apresentar um *hit* para **Kunitz_legume**, indicando que sua função está diretamente relacionada à inibição de serino-proteases. As IPs 1, 3, 4 e 5 apresentaram domínios conservados associados à superfamília **beta-trefoil_STI**, caracterizada por inibidores de tripsina da soja. Já a IP 2 não apresentou correspondência com domínios conservados no banco de dados Pfam.

5.5 Análise de toxicidade em espécie modelo macrófita aquática

A toxicidade das frações proteicas enriquecidas com IPs foi avaliada com base na relação dose-resposta, utilizando concentrações das frações que variavam de 50 a 400 μ L. Ao final do período experimental, observou-se que a fração 0-60% apresentou maior inibição de crescimento de *L. aequinoctialis* comparativamente com as demais frações e ao controle, como pode ser observado na **figura 6**. É importante ressaltar que mesmo nas menores doses, a fração 0-60% foi capaz de reduzir significativamente (p -valor > 0.001) o crescimento das lentilhas-d'água em relação aos demais tratamentos, demonstrando seu potencial de toxicidade.

1) Primeiro dia de experimento (dia 0)



2) Último dia de experimento (dia 8)

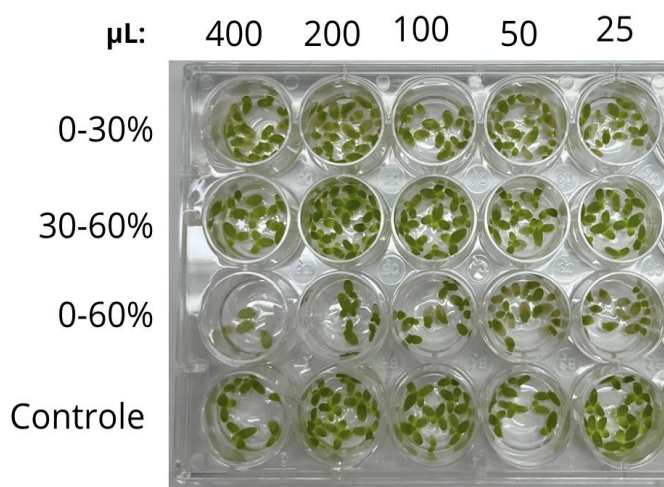
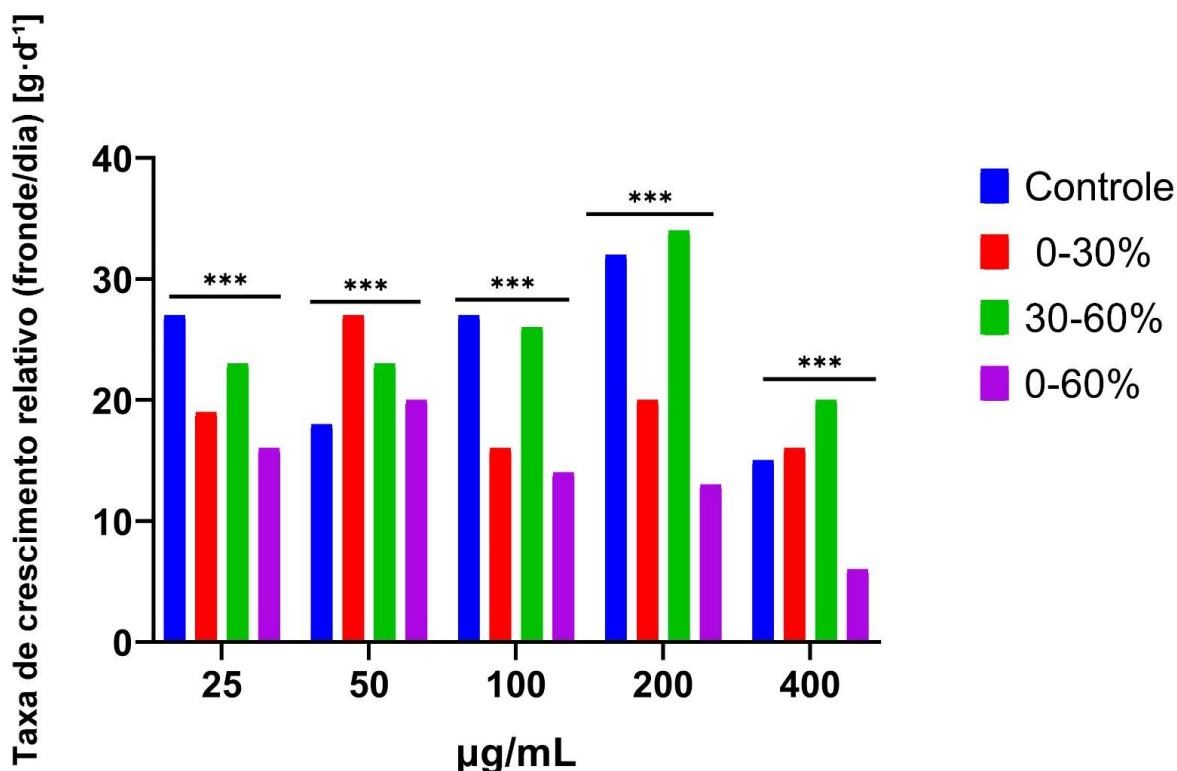


Figura 8. Teste de toxicidade em diferentes doses de extratos das frações proteicas: 1. Início do experimento de toxicidade, dia 0, em placa de 24 poços com diferentes concentrações dos extratos proteicos fracionados de palma forrageira utilizando frondes padronizadas de lentilhas-d'água como modelo biológico. 2. Final do experimento de toxicidade, dia 8, apresentando a diferença de crescimento de biomassa das lentilhas-d'água no fracionamento mais hidrofóbico (0-60%). Fonte: A autora (2024).

Gráfico 1: Taxa de crescimento relativo, conforme $RGR = [\ln(n_8) - \ln(n_{t0})] / 8$. As taxas foram avaliadas por ANOVA seguido de teste estatístico de Tukey, onde cada ponto do dado representa a média dos valores das triplicatas biológicas. Barras de erros indicam desvio-padrão. Anova e teste de Tukey estabelecidos em $p < 0,01$, onde ns = não significativo e *** = significativo a 1% em relação ao controle.



Fonte: A autora (2025).

Evidencia-se a presença de clorose e necrose em várias regiões das frondes das plantas tratadas com 400 µg/mL das frações, visualizados em microscopia óptica, conforme as **figuras 8 a 13**. Provavelmente, diferentes moléculas peptídicas, com diferentes padrões de solubilidade em sulfato de amônio e hidrofobicidade, presentes em cada subfração analisada do proteoma enriquecido de inibidores de protease possuem atividades com ação específica diferencial nas células vegetais testadas resultando em respostas variadas de inibição de crescimento e danos ao metabolismo e a estruturas das células. Enquanto que no **gráfico 1**, o teste estatístico destaca grau de significância em todas as concentrações comparadas entre diferentes extratos, correlacionado com os resultados apresentados pela placa observada na **figura 8**.

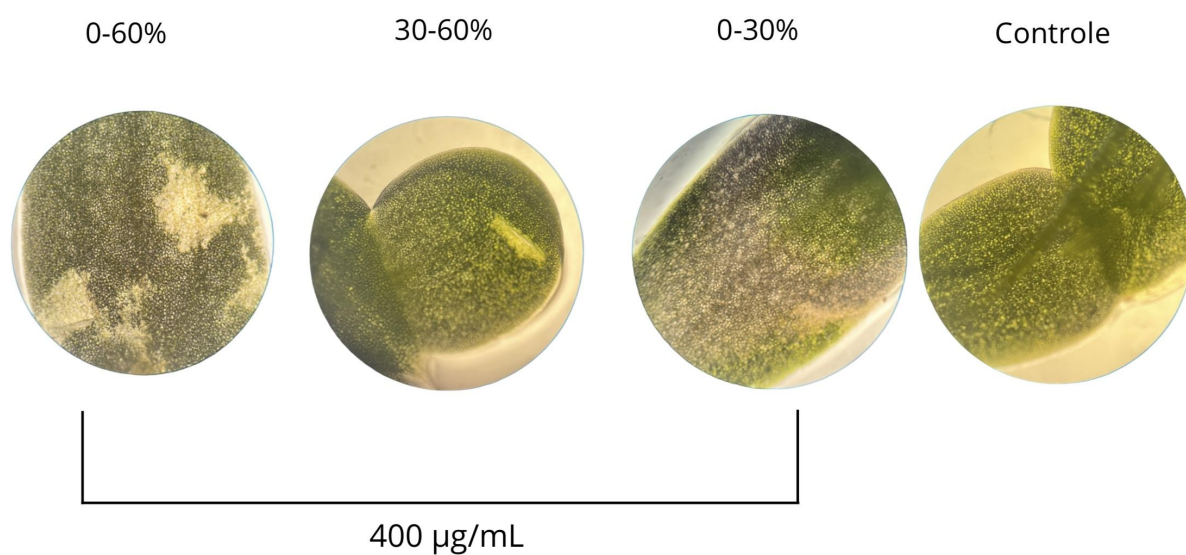


Figura 9. Visualização em microscopia óptica das lentilhas-d'água afetadas nas diferentes concentrações dos extratos em comparação com o controle. Fonte: A autora (2024).

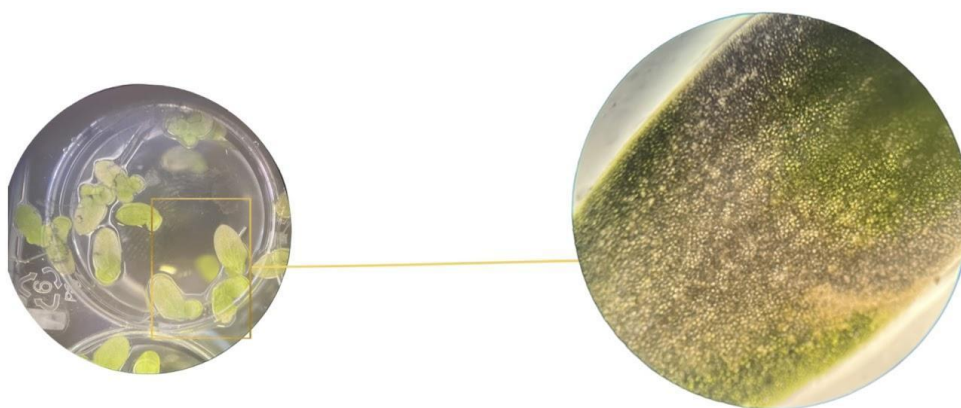


Figura 10. Comparação macro e microscópica evidenciando o processo de clorose e inibição de crescimento no fracionamento 0-30% visto na lupa e no microscópio com aumento da objetiva 10x 0.25. Fonte: A autora (2024).

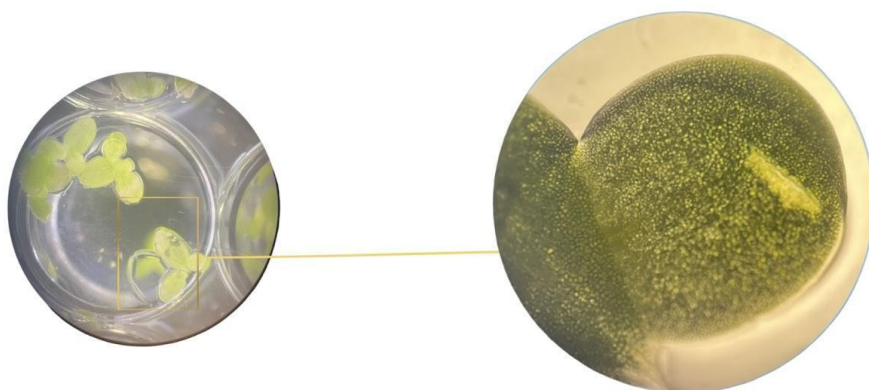


Figura 11. Comparação macro e microscópica evidenciando o processo de clorose/necrose e inibição de crescimento no fracionamento 30-60% visto na lupa e no microscópio com aumento da objetiva 10x 0.25. Fonte: A autora (2024).

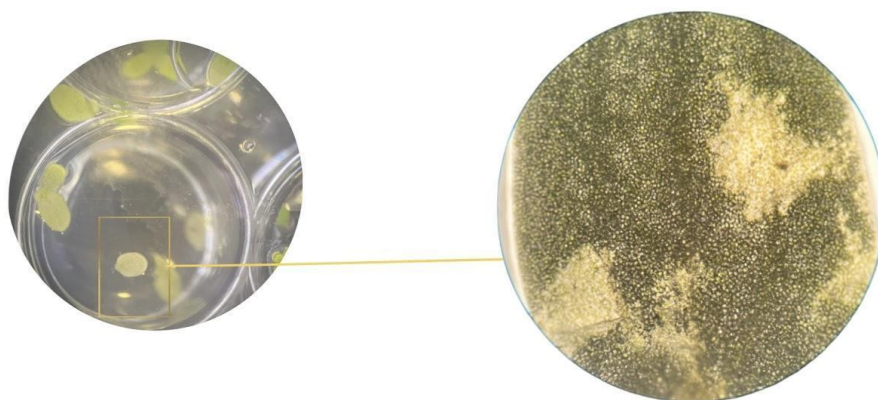


Figura 12. Comparação macro e microscópica evidenciando o processo de clorose/necrose e inibição de crescimento no fracionamento 30-60% visto na lupa e no microscópio com aumento da objetiva 10x 0.25. Fonte: A autora (2024).

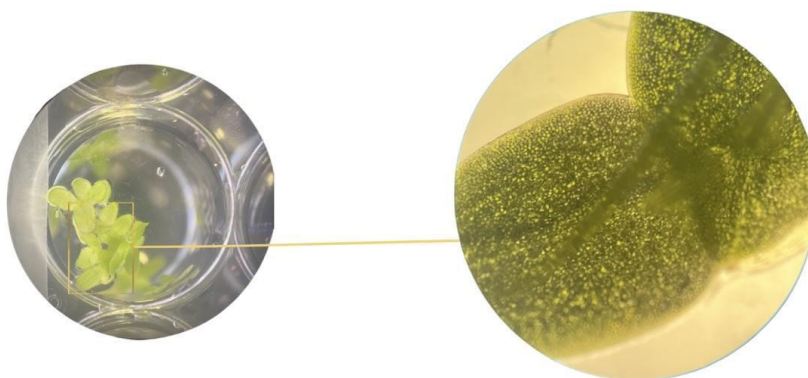


Figura 13. Comparação macro e microscópica do controle positivo, evidenciando o crescimento e processo de clorose vistos na lupa e no microscópio com aumento da objetiva 10x 0.25. Fonte: A autora (2024).

6 DISCUSSÃO

6.1 Prospecção *in silico* de produtos gênicos associados a inibidores de protease no proteoma presumível da palma forrageira

As análises *in silico* de proteomas das espécies *O. ficus-indica*, *O. cochenillifera* e *O. streptacantha* obtidas revelaram diversidade de sequências com domínios específicos associados à IPs, demonstrando a predominância e grande aplicabilidade dessas moléculas para o funcionamento e manutenção das atividades fisiológicas necessárias a homeostase da palma forrageira. Estudos realizados anteriormente, já demonstram potencial introdução de inibidores de protease no setor terapêutico como demonstrado por Sokja; Šnebergerová; Robbertse, 2021. Isso reforça a relevância biotecnológica das IPs encontradas em palma forrageira e aumenta a necessidade de pesquisas relacionadas ao grau de toxicidade associado aos inibidores dessa planta. A pesquisa teórica realizada sobre as espécies do gênero *Opuntia* foi fundamental para estimar a produção de inibidores de protease em *Opuntia stricta*, além de contribuir para a compreensão do seu grau toxicológico e da expressão desses inibidores. Esse entendimento foi baseado em estudos prévios sobre as ações dos diferentes IPs identificados nas demais espécies do gênero.

6.2 Análise da integridade dos extratos fracionados por Gel SDS-PAGE

A precipitação realizada por sulfato de amônio garantiu as atividades bioativas das proteínas e também sua integridade, ou seja, não houve desnaturação das proteínas precipitadas nos extratos, condizente com metodologia descrita anteriormente por Heidtmann et al., 2012. A confirmação da integridade proteica foi analisada por gel de eletroforese SDS-PAGE de poliacrilamida, onde pôde-se observar a distribuição das proteínas ao longo do gel, demonstrando os diferentes pesos moleculares das proteínas obtidas dos extratos fracionados, e evidenciando também que não houve contaminação, semelhante ao de Takemori et al., 2020.

Pode-se observar que as proteínas da fração 0-30% (poço 2) apresentaram maior faixa de peso molecular, variando de 14 a 66 KDa, enquanto as proteínas obtidas na fração de 30-60% (poço 3) se concentraram em faixa de menor peso molecular, podendo ser visualizadas próximo ao marcador de 30 KDa (Figura 1). A fração 0-60% (poço 4) representa a precipitação conjunta das proteínas. Por ser o conjunto das duas outras frações a faixa de 0-60% precipitou as mesmas proteínas presentes nos dois outros extratos, indicando a presença dos mesmos produtos e a possibilidade da precipitação de mais proteínas ainda não apresentadas nos outros extratos.

6.3 Identificação e caracterização dos inibidores de protease encontrados nos extratos proteicos

A confirmação da presença de inibidores de protease (IPs) nos extratos fracionados de palma forrageira, identificados com eficiência por espectrometria de massas (LC-MS/MS), evidencia a importância dessas moléculas nos processos de defesa e homeostase da planta, sugerindo, ainda, possíveis aplicações biotecnológicas futuras. O método de espectrometria de massas utilizado para a identificação das IPs demonstrou-se eficaz e preciso, conforme descrito por Percy et al., 2013.

A presença de maior quantidade de inibidores na fração 0–30% pode estar relacionada à atividade tóxica observada nesse extrato. Por apresentar as mesmas proteínas detectadas nos extratos anteriores, a fração 0–60% foi utilizada como controle positivo nos testes de toxicidade.

As análises realizadas com ferramentas de bioinformática também se mostraram relevantes, considerando que o objetivo principal era verificar e correlacionar as IPs identificadas nos extratos de palma com moléculas bioativas já descritas na literatura, com atividade biotecnológica significativa. O Blastp detectou alinhamentos semelhantes entre as IPs da palma forrageira e inibidores de protease presentes em *Spinacia oleracea*, *Beta vulgaris* e *Chenopodium quinoa*, espécies pertencentes à família Amaranthaceae, já descritas na literatura com potencial biotecnológico relevante, inclusive nas áreas terapêutica e nutricional, conforme abordado por Casalvara et al., 2024.

A relação de similaridade apresentada entre as IPs de *Opuntia streptacantha* e as três espécies da família Amaranthaceae reforça a relevância biotecnológica da palma forrageira, além de evidenciar a importância do espinafre, da beterraba e da quinoa (nomes populares das espécies citadas, respectivamente).

A localização intracelular dos inibidores de protease está diretamente relacionada à função molecular por eles desempenhada, o que indica que cada IP presente em determinada região da célula possui uma função específica, voltada à manutenção da homeostase. Inibidores extracelulares, por exemplo, podem estar associados à preservação da matriz extracelular, contribuindo para a homeostase tecidual. Já os inibidores localizados no citoplasma parecem atuar na estabilidade intracelular, enquanto aqueles presentes na membrana celular possivelmente participam do controle da entrada de moléculas. Considerando que mitocôndrias e cloroplastos possuem material genético próprio, é plausível que os inibidores de protease localizados nessas organelas desempenhem funções específicas de defesa, atuando como agentes protetores.

Os domínios conservados identificados nas IPs, em conjunto com os padrões de interação observados na árvore filogenética, reforçam a importância evolutiva dessas proteínas no processo de defesa da planta e indicam seu possível uso contra patógenos virais. A IP 4, por exemplo, possui um domínio associado à superfamília *Beta-trefoil_TSI*, mas encontra-se distante, na árvore filogenética, de outras proteínas que compartilham esse mesmo domínio. Isso pode indicar que outras regiões da proteína se modificaram ao longo da evolução, enquanto o domínio funcional foi mantido por apresentar vantagens seletivas. A possibilidade de tais domínios estarem associados à inibição de proteases virais foi discutida por Alonso-Del-Rivero et al., 2012.

Embora algumas proteínas tenham sido classificadas como “não caracterizadas”, a presença desses domínios funcionais é indicativa de sua possível atuação celular, corroborando a relevância do estudo das sequências proteicas presentes nos inibidores. As IPs 6 e 7, por exemplo, pertencem à mesma *CY superfamily* e estão próximas na árvore filogenética, o que pode indicar a importância funcional desse domínio e sua preservação por seleção natural. Ambas também estão presentes no mesmo precipitado fracionado, associado a uma fase

estacionária, o que pode sugerir menor hidrofobicidade e, possivelmente, justificar a menor toxicidade observada no extrato 30–60%, quando comparado aos demais.

6.4 Avaliação da toxicidade dos extratos fracionados com modelo biológico macrófita aquática (lentilha-d'água)

A avaliação da toxicidade das frações proteicas com base na relação dose-resposta permitiu observar gradativamente o crescimento de *Lemna aequinotialis* em diferentes concentrações dos extratos fracionados. A abordagem do teste mostrou-se relevante ao evidenciar os graus de toxicidade apresentados separadamente por cada fração e de forma comparativa entre as doses, estando de acordo com pesquisa de Nati et al., 2024.

O perfil de inibição do crescimento da lentilha-d'água assemelhou-se ao descrito por Jmii; Dewez, 2021. Comparando os padrões toxicológicos de cada fração, pode-se constatar que os três fracionamentos apresentaram toxicidades distintas entre si, embora tenham causado inibições e clorose relativamente semelhantes entre as concentrações de um mesmo extrato fracionado.

Possivelmente por conter uma junção das proteínas presentes nas frações menores, o precipitado 0–60% apresentou a maior taxa de inibição do crescimento desde o dia 0 até o último dia do experimento (dia 8), além de provocar processos significativos de clorose, como observado por microscopia óptica, o que reforça seu alto grau de toxicidade. Devido à elevada taxa de inibição observada, optou-se por não utilizar a fração 0–60% como tratamento ativo, sendo empregada como controle positivo de inibição em relação às outras frações.

Seguindo essa lógica, os testes com a fração 0–30%, embora menos inibitórios, em comparação com a fração 0-60%, também apresentaram altos níveis de clorose nas frondes. Já a fração 30–60% foi a que menos inibiu o crescimento da lentilha-d'água, com resultados semelhantes aos observados no controle. Dessa forma, o extrato 30–60% seria o mais indicado para possíveis aplicações terapêuticas.

Além disso, observa-se que as frações precipitadas sem o uso de uma fase estacionária (sem intervalos de precipitação) apresentaram maior grau toxicológico do que aquelas que passaram por etapas de precipitação fracionada (como a fração

30–60%). Isso sugere que a presença de toxicidade pode estar relacionada à maior hidrofobicidade de certas proteínas, conforme demonstrado por Mannini et al., 2014.

Vale salientar que os graus toxicológicos apresentados em todos os fracionamentos não podem ser diretamente atribuídos apenas à presença de inibidores de protease, uma vez que essas moléculas não foram isoladas das demais proteínas presentes nos extratos. No entanto, observa-se que os extratos com maior concentração de inibidores de protease também apresentaram maior toxicidade, indicando a necessidade de estudos futuros para isolar cada inibidor e testar seu grau toxicológico individualmente.

7 CONCLUSÃO

7.1 identificação e caracterização dos inibidores de protease presentes nos fracionamentos

A identificação e caracterização funcional dos inibidores de protease (IPs) presentes nas frações proteicas que foram obtidas dos cladódios de *Opuntia stricta*, por meio da análise proteômica diferencial e ferramentas de bioinformática, foi fundamental para compreender suas funções e especificidades biológicas, além de revelar seu potencial para aplicações biotecnológicas. Foram identificadas sete proteínas relacionadas a IPs, distribuídas entre as frações 0–30% (quatro IPs) e 30–60% (três IPs). Esses achados não excluem a possibilidade de estudos adicionais visando identificar mais IPs no proteoma de *O. stricta*. Contudo, a ausência de um banco de dados genômico específico para *O. stricta* limitou a análise, exigindo a utilização de sequências de espécies correlatas do gênero *Opuntia*. Ainda assim, o uso de indivíduos de *O. stricta* neste estudo inaugura novas possibilidades de pesquisa com essa espécie, ampliando as perspectivas para o desenvolvimento de abordagens inovadoras no aproveitamento biotecnológico da palma forrageira.

7.2 Análise e avaliação da toxicidade de extratos proteicos enriquecidos com inibidores de protease

Ao longo deste trabalho, avaliou-se a toxicidade de extratos proteicos fracionados e enriquecidos com inibidores de protease, obtidos dos cladódios de *Opuntia stricta*. Utilizando *Lemna aequinoctialis* como modelo, observou-se que as frações 0-30% e 30-60% dos extratos causaram inibições significativas no crescimento da macrófita e induziram clorose nas frondes em comparação com o controle e a fração 30-60%. Esses resultados ressaltam a necessidade de estudos de toxicidade adicionais para verificação de potenciais aplicações terapêuticas e sugerem uma possível associação entre a toxicidade observada e a presença de inibidores de protease. Apesar da eficácia do modelo com lentilha-d'água,

recomenda-se a realização de testes adicionais, com outros modelos biológicos e análises bioquímicas, para uma caracterização mais abrangente do perfil toxicológico dos extratos e validação de sua segurança para uso medicinal.

8 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, Sara Camêlo et al. Vulnerabilidade da palma forrageira e pecuária bovina no Estado da Paraíba frente ao ataque da cochonilha do carmim. *Revista de Geociências do Nordeste*, v. 5, p. 104–115, 2019.
- ALONSO-DEL-RIVERO, Maday et al. Tri-domain bifunctional inhibitor of metallocarboxypeptidases A and serine proteases isolated from marine annelid *Sabellastarte magnifica*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 19, p. 15427–15438, 2012.
- ALVES, Marta Assunção et al. *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller: caracterização física, físico-química e química de frutos produzidos no estado de Pernambuco – Brasil. *Arquivos Brasileiros de Alimentação*, v. 4, n. 2, p. 398–415, 2019.
- AMM, Ingo; SOMMER, Thomas; WOLF, Dieter H. Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin–proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1843, n. 1, p. 182–196, 2014.
- BALTAR, Solma Lúcia Souto Maior de Araújo et al. Aspectos botânicos e clínicos das intoxicações por plantas das famílias *Araceae*, *Euphorbiaceae* e *Solanaceae* no Estado de Pernambuco. 2017. Trabalho acadêmico não publicado.
- BARROS, Fellype Abreu. Cultivo de palma forrageira em sistemas consorciados na região semiárida brasileira – uma revisão. 2022. Trabalho acadêmico não publicado.
- BARROS, Ileanne Oliveira; SOARES, Arlete Aparecida. Adaptações anatômicas em folhas de marmeleiro e velame da caatinga brasileira. *Revista Ciência Agronômica*, v. 44, p. 192–198, 2013.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRAGA, Márcia Regina; DIETRICH, Sônia. Defesas químicas de plantas: fitoalexinas. *Acta Botanica Brasilica*, v. 1, p. 3–16, 1987.
- BRASIL, Suane de Oliveira Souza et al. Palma forrageira: uma oportunidade socioeconômica para o semiárido brasileiro. *Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa – Congrega Urcamp*, p. 1339–1353, 2018.
- BRULFERT, J. et al. Characterization of carbon metabolism in *Opuntia ficus-indica* Mill. exhibiting the idling mode of Crassulacean acid metabolism. *Planta*, v. 170, p. 92–98, 1987.
- BUONO, Rafael Andrade; HUDECEK, Roman; NOWACK, Moritz K. Plant proteases during developmental programmed cell death. *Journal of Experimental Botany*, v. 70, n. 7, p. 2097–2112, 2019.

CASTAÑEDA-ARRIAGA, Romina et al. Antioxidants into nopal (*Opuntia ficus-indica*): important inhibitors of free radicals' formation. *Antioxidants*, v. 10, n. 12, p. 2006, 2021.

CAMPOS, F. S. et al. Alternativa de forragem para caprinos e ovinos criados no semiárido. *Nutritime Revista Eletrônica*, v. 14, n. 2, p. 5004–5013, 2017.

CAMPOS, Maria João de Brito. *Propriedades biológicas e aplicações do fruto Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. 2016. Dissertação (Mestrado) – Instituição não informada.

CAMPOS, S. C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 18, p. 373–382, 2016.

CASALVARA, Rhaira Fernanda Ayoub et al. Biotechnological, nutritional, and therapeutic applications of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and its by-products: a review of the past five-year findings. *Nutrients*, v. 16, n. 6, p. 840, 2024.

CHAVES, Thiago Pereira. *Variação sazonal na produção de metabólitos secundários e na atividade antimicrobiana de espécies vegetais do Semiárido Brasileiro*. 2012. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

CRYNS, Vincent; YUAN, Junying. Proteases to die for. *Genes & Development*, v. 12, n. 11, p. 1551–1570, 1998.

CZELUSNIAK, K. E. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 14, p. 400–409, 2012.

DA FROTA, Marcílio Nilton Lopes et al. Palma forrageira na alimentação animal. 2015. Trabalho acadêmico não publicado.

DAMASCENO, Gabriel Azevedo de Brito et al. Use of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill extracts from Brazilian Caatinga as an alternative of natural moisturizer in cosmetic formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 52, p. 459–470, 2016.

DAS CHAGAS, M. C. M. et al. Cochonilha de escama na palma forrageira: aspectos biológicos e estratégias de manejo. 2018. Trabalho acadêmico não publicado.

DAVID TRONCOSO, Franco; ALBERTO SÁNCHEZ, Daniel; LUJÁN FERREIRA, María. Production of plant proteases and new biotechnological applications: an updated review. *ChemistryOpen*, v. 11, n. 3, p. e202200017, 2022.

DE ASSIS, Leonardo Oliveira et al. Determinação da atividade inibitória de enzimas digestivas em suplementos vendidos no comércio internacional à base de proteína vegetal. *RBNE – Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, v. 11, n. 67, p. 925–933, 2017.

DE ARAÚJO DANTAS, Suênia Flávia; DA COSTA LIMA, Guilherme Ferreira; DA MOTA, Edson Pereira. Viabilidade econômica da produção de palma forrageira

irrigada e adensada no semiárido potiguar. *Revista iPecege*, v. 3, n. 1, p. 59–74, 2017.

DE MACEDO, Karlla Gonçalves; DE MELO FILHO, Cleber Camilo; ANDRADE, Carolina Horta. Avaliação in silico da toxicidade de fármacos. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 10, n. 1, p. 1–1, 2013.

DE MOURA, Magna Soelma Beserra et al. Aptidão do Nordeste brasileiro ao cultivo da palma forrageira sob cenários de mudanças climáticas. 2011. Trabalho acadêmico não publicado.

DE QUEIROZ, Maria Gabriela et al. Relações hídrico-econômicas da palma forrageira cultivada em ambiente semiárido. *Irriga*, v. 1, n. 1, p. 141–141, 2016.

DONATO, Paulo E. R. et al. Morfometria e rendimento da palma forrageira ‘Gigante’ sob diferentes espaçamentos e doses de adubação orgânica. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v. 9, n. 1, p. 151–158, 2014.

DOS SANTOS, Maria de Fátima Rufino; DE SOUSA, Rita de Cássia Pompeu; DA SILVA FERKO, Geórgia Patrícia. Prospecção da palma forrageira para alimentação humana: planta exótica radicada no Brasil. *Revista Eletrônica Casa de Makunaima*, v. 5, n. 2, p. 19–37, 2023.

DOS SANTOS NUNES, Cleonice. Usos e aplicações da palma forrageira como uma grande fonte de economia para o semiárido nordestino. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 6, n. 1, p. 8, 2011.

DOS SANTOS SOUZA, Bruna et al. Potencial energético da palma forrageira. *Cadernos de Agroecologia*, v. 15, n. 4, 2020.

DUTRA, Maria de Fátima Batista. A biotecnologia como instrumento de desenvolvimento social e ambiental aplicado à palma forrageira. 2021. Trabalho acadêmico não publicado.

FARIAS, Patrícia Marques de. Extração e caracterização do extrato de palma forrageira e avaliação do potencial antioxidante em modelo de lesão gástrica induzida por etanol. 2016. Tese de mestrado ou doutorado (não especificado).

FECHINE, José Mogahid. Proteômica diferencial de *Lemna aequinoctialis* sob estresse por cádmio. 2020. Trabalho acadêmico não publicado.

FERNANDES, C. de F. et al. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. *Embrapa Rondônia. Documentos*, v. 133, 2009.

FERNANDES, Danuza de Oliveira; BELUCE, Luís Otávio Passos. Palma forrageira e sua utilização na alimentação de animais. 2023. Trabalho acadêmico não publicado.

FLÓREZ, Daniela Porras; ALBESIANO, Sofia; VIOLET, Leopoldo Arrieta. El género *Opuntia* (Opuntioideae–Cactaceae) en el departamento de Santander, Colombia. *Biota Colombiana*, v. 18, p. 2, 2017.

GODOY, Cláudia V.; AMORIM, Lilian; BERGAMIN FILHO, Armando. Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infectadas por *Phaeosphaeria maydis*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, p. 209–215, 2001.

GÓMEZ-GARCÍA, Iker et al. Usefulness of *Opuntia* spp. on the management of obesity and its metabolic co-morbidities. *Nutrients*, v. 16, n. 9, p. 1282, 2024.

GONÇALVES, Glaucia Barretto et al. Óleo de dendê: alternativa para o manejo agroecológico da cochonilha de escamas da palma forrageira *Diaspis echinocacti* (Hemiptera: Diaspididae). *Cadernos de Agroecologia*, v. 15, n. 2, 2020.

GRIFFITH, M. Patrick. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. *American Journal of Botany*, v. 91, n. 11, p. 1915–1921, 2004.

GUERRERO-BELTRÁN, José Á.; OCHOA-VELASCO, Carlos E. Figo da Índia—*Opuntia* spp. In: Exotic fruits. Academic Press, 2018. p. 187–201.

GULLAN, P. J.; COOK, L. G. Phylogeny and higher classification of the scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea). *Zootaxa*, v. 1668, n. 1, p. 413–425, 2007.

GULLAN, Penny J.; KOSZTARAB, Michael. Adaptations in scale insects. *Annual Review of Entomology*, v. 42, n. 1, p. 23–50, 1997.

GUPTA, M. The importance of pharmaceutical toxicology in drug development. *Journal of Pharmaceutical Toxicology*, [S.l.], v. 6, n. 2, p. 29–32, 2023.

HARTL, Markus et al. The multiple functions of plant serine protease inhibitors: defense against herbivores and beyond. *Plant Signaling & Behavior*, v. 6, n. 7, p. 1009–1011, 2011.

HEIDTMANN, Renata Bemvenuti et al. Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 15, p. 41–49, 2012.

ISRAEL, Alvaro A.; NOBEL, Park S. Activities of carboxylating enzymes in the CAM species *Opuntia ficus-indica* grown under current and elevated CO₂ concentrations. *Photosynthesis Research*, v. 40, p. 223–229, 1994.

JÚNIOR, José Geraldo Bezerra Galvão et al. Palma forrageira na alimentação de ruminantes: cultivo e utilização. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 8, n. 2, p. 78–85, 2014.

JMII, Souleimen; DEWEZ, David. Toxic responses of palladium accumulation in duckweed (*Lemna minor*): determination of biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 40, n. 6, p. 1630–1638, 2021.

KAUR, Simardeep et al. How do plants defend themselves against pathogens—biochemical mechanisms and genetic interventions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, v. 28, n. 2, p. 485–504, 2022.

KUEHNEMANN, Chisaka et al. Antiretroviral protease inhibitors induce features of cellular senescence that are reversible upon drug removal. *Aging Cell*, v. 22, n. 1, p. e13750, 2023.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAVANDEIRA, Fernanda Márcia Ferreira. Ensaios toxicológicos pré-clínicos na avaliação da segurança de novos fármacos. 2014. Tese (Doutorado).

LIMA, Deneson Oliveira; DE ALMEIDA ARAÚJO, Cleyton; DE MELO, Lenivaldo Manoel. Análise descritiva do custo de implantação de palma forrageira em plantio de sequeiro no semiárido alagoano: um estudo de caso. *Diversitas Journal*, v. 5, n. 2, p. 1271–1280, 2020.

LOPES, Levi et al. Palma forrageira na alimentação de ruminantes. *Pubvet*, v. 13, p. 170, 2019.

LOPES, R. de V. V.; SILVA, F. L. H. da. Elaboração de fermentados a partir do figo-da-índia. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 6, n. 2, p. 305–315, 2006.

MADRIGAL-SANTILLÁN, Eduardo et al. *Opuntia spp. in Human Health: A Comprehensive Summary on Its Pharmacological, Therapeutic and Preventive Properties. Part 2. Plants*, v. 11, n. 18, p. 2333, 2022.

MAGALHÃES, Regina Maria Fontenele. Estratégias de adubação potássica e nitrogenada no cultivo de palma forrageira em área de Cerrado. 2023. Tese (Doutorado).

MAJEROVÁ, Taťána; KONVALINKA, Jan. Viral proteases as therapeutic targets. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 88, p. 101159, 2022.

MANDAL, Anirban; JHA, Ajeet Kumar; HAZRA, Banasri. Plant products as inhibitors of coronavirus 3CL protease. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, p. 583387, 2021.

MANNINI, Benedetta et al. Toxicity of protein oligomers is rationalized by a function combining size and surface hydrophobicity. *ACS Chemical Biology*, v. 9, n. 10, p. 2309–2317, 2014.

MARTIM, Salomão Rocha et al. Proteases ácidas de cogumelo comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi – Ciências Naturais*, v. 12, n. 3, p. 353–362, 2017.

MARTINS, D. dos S. et al. Scale insect (Hemiptera: Coccoidea) pests of papaya (*Carica papaya*) in Brazil. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 108, n. 1, p. 35–42, 2015.

MARTINS, Liliana Patrícia de Sousa. Efeitos tóxicos subletais de paracetamol em dois níveis de organização biológica: *Lemna minor* e *Daphnia magna*. 2013. Tese (Doutorado).

MATOS, Laudiceio Viana et al. Sistemas tradicionais de produção de palma forrageira ‘Gigante’ em agroecossistemas do Semiárido baiano. *Revista Brasileira de Geografia Física*, v. 14, n. 2, p. 554–590, 2021.

MESQUITA, Tiago Barbosa. Efeito de fertilização sobre o estabelecimento da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) para recuperação de área de Cerrado degradado em Selvíria/MS. 2023. Trabalho acadêmico não publicado.

MILLER, D. R.; KOSZTARAB, M. Recent advances in the study of scale insects. *Annual Review of Entomology*, v. 24, p. 1–27, 1979.

MOURA, Evily Ribeiro et al. Explorando o potencial da palma forrageira (*Opuntia*): uma análise abrangente para impulsionar os biocombustíveis no semiárido brasileiro. *Observatório de la Economía Latinoamericana*, v. 22, n. 6, p. e5256–e5256, 2024.

MOURA, Renally de Lima et al. Efeito do consumo da farinha de palma (*Opuntia ficus-indica*) sobre o comportamento de ansiedade em ratos idosos. 2023. Trabalho acadêmico não publicado.

NATH, Mriganka; GOSWAMI, Subhasish. Toxicity detection in drug candidates using simplified molecular-input line-entry system. *arXiv Preprint arXiv:2101.10831*, 2021.

NAITHANI, Nardeep et al. Precision medicine: uses and challenges. *Medical Journal Armed Forces India*, v. 77, n. 3, p. 258–265, 2021.

NATI, Natalia et al. Cytotoxicity, chemical, and nutritional profile evaluation of biomass extracts of the *Lemna aequinoctialis* (duckweed) aquatic plant. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 87, n. 23, p. 934–952, 2024.

NECCHI, Raquel Medina Martins et al. Teor de minerais, perfil oxidativo e toxicidade de *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dick (Cactaceae). 2016. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Maria.

NEVES, André Luis Alves et al. Plantio e uso da palma forrageira na alimentação de bovinos leiteiros no semiárido brasileiro. 2010. Trabalho acadêmico não publicado.

NUNES, C. S. Usos e aplicações da palma forrageira como uma grande fonte de economia para o semiárido nordestino. *Revista Verde*, Mossoró, v. 6, p. 58–66, 2011.

OLIVEIRA, Dênis Coelho de et al. Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera: Psyllidae). *Brazilian Journal of Botany*, v. 29, p. 657–667, 2006.

OLIVEIRA, Melissa Fernanda de et al. A importância nutricional da alimentação complementar. 2017. Trabalho acadêmico não publicado.

PAPANEOPHYTOU, Christos. Breaking the Chain: Protease Inhibitors as Game Changers in Respiratory Viruses Management. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 15, p. 8105, 2024.

PARASURAMAN, S. Toxicological screening. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, v. 2, n. 2, p. 74, 2011.

PAULINO, Raniere de Sá et al. Manejo de utilização da palma forrageira sobre a qualidade microbiológica, desempenho e distúrbios nutricionais em ovinos. 2019. Trabalho acadêmico não publicado.

PERCY, Andrew J. et al. Standardized protocols for quality control of MRM-based plasma proteomic workflows. *Journal of Proteome Research*, v. 12, n. 1, p. 222–233, 2013.

PEREIRA, Leonardo dos Santos et al. *Lentilha d'água*. 2022. Trabalho acadêmico não publicado.

PERPÉTUO, Natacha Catarina et al. Breve história da toxicologia vegetal: alguns usos das plantas tóxicas ao longo do tempo. *História da Ciência e Ensino: construindo interfaces*, v. 20, p. 248–264, 2019.

PIO, Mauro Célio da Silveira; SOUZA, Katiúscia dos Santos de; SANTANA, Genilson Pereira. Capacidade da *Lemna aequinoctialis* para acumular metais pesados de água contaminada. *Acta Amazônica*, v. 43, p. 203–210, 2013.

POINCARÉ, Henri. *A ciência e a hipótese*. Tradução de Carlos W. Porto Carreiro. São Paulo: Hemus, 1982.

POTT, Vali Joana; CERVI, Armando Carlos. A família Lemnaceae Gray no Pantanal (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Brasil. *Brazilian Journal of Botany*, v. 22, p. 153–174, 1999.

POTT, Vali Joana; POTT, Arnildo. Potencial de uso de plantas aquáticas na despoluição da água. Embrapa Gado de Corte, 2002. Documentos técnicos.

RADIĆ, Sandra et al. *Duckweed Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, n. 2, p. 182–187, 2011.

RESENDE, M. L. V. de et al. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 15, p. 173–242, 2007.

REYES-AGÜERO, J. Antonio; AGUIRRE-RIVERA, J. Rogelio; HERNÁNDEZ, Héctor M. Systematic notes and a detailed description of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). *Agrociencia*, v. 39, n. 4, p. 395–408, 2005.

REKOWSKI, Azin et al. Determination of soluble wheat protein fractions using the Bradford assay. *Cereal Chemistry*, v. 98, n. 5, p. 1059–1065, 2021.

ROCHA, J. E. da S. Palma forrageira no Nordeste do Brasil: estado da arte. 2012. Trabalho acadêmico não publicado.

RODRIGUES, Maria Cristina Soares; OLIVEIRA, Cesar de. Interações medicamentosas e reações adversas a medicamentos em polifarmácia em idosos: uma revisão integrativa. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, v. 24, p. e2800, 2016.

SANTOS, Humberto Vitorino dos et al. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha de *Alternaria* dos cladódios da palma forrageira miúda (*Nopalea chochenillifera*). 2010. Trabalho acadêmico não publicado.

SANTOS, Mikaella de Moura. Perfil fitoquímico da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) e atividade cicatrizante in vivo. 2013. Trabalho acadêmico não publicado.

SARAIVA, Sylbênia Alves Machado et al. Recuperação de área degradada com o cultivo da palma forrageira (*Opuntia stricta* Haw) adubada com biossólido. 2017. Trabalho acadêmico não publicado.

SENA, Wilson de Lima et al. Avaliação preliminar do extrato de Coité no controle da cochonilha-de-escama em palma forrageira. 2021. Trabalho acadêmico não publicado.

SHEN, Wenzhong et al. Arabidopsis aspartic protease ASPG1 affects seed dormancy, seed longevity and seed germination. *Plant and Cell Physiology*, v. 59, n. 7, p. 1415–1431, 2018.

SILVA, Bárbara Laine Ribeiro da. Ecofisiologia e morfoanatomia de herbáceas em florestas secas em regeneração. 2016. Trabalho acadêmico não publicado.

SILVA, Camila dos Santos. Avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e toxicidade aguda da mucilagem de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*). 2015. Trabalho acadêmico não publicado.

SILVA, Paula Priscila Paixão et al. Determinação da atividade antimicrobiana e avaliação da toxicidade do *Cereus jamacaru* and *Opuntia ficus-indica* (palma forrageira). *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 14, n. 3, p. 201–?*, 2017. (Assumindo padrão; verifique paginação se necessário.)

SILVA, T. G. P. et al. Mineral content and bioactive compounds in cactus cladodes varieties. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 76, n. 1, p. 167–171, 2024.

SILVA, Thieres George Freire et al. Indicadores de eficiência do uso da água e de nutrientes de clones de palma forrageira em condições de sequeiro no semiárido brasileiro. *Bragantia*, v. 73, p. 184–191, 2014.

SOJKA, Daniel; ŠNEBERGEROVÁ, Pavla; ROBBERTSE, Luise. Protease inhibition—an established strategy to combat infectious diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 11, p. 5762, 2021.

SOUZA, Cássia Cabral; AQUINO, Sérgio Francisco; SILVA, Silvana de Queiroz. Ensaio toxicológicos aplicados à análise de águas contaminadas por fármacos. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 25, n. 2, p. 217–228, 2020.

SOUSA, Iara Almeida; DA SILVA LUZ, Vanessa; ARAUJO, Jeorgio Leão. Reações adversas e interações medicamentosas em fármacos usados na cardiologia. *Revista de Casos e Consultoria*, v. 13, n. 1, p. e30943, 2022.

SOUZA, Jaqueline Pérola. Toxicidade aguda e risco ambiental do diflubenzuron para *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* e *Lemna minor* na ausência e presença de sedimento. 2008. Trabalho acadêmico não publicado.

TAKEMORI, Ayako et al. PEPPI-MS: polyacrylamide-gel-based prefractionation for analysis of intact proteoforms and protein complexes by mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, v. 19, n. 9, p. 3779–3791, 2020.

TIAN, Xiaoli et al. Sexual dimorphism of antenna of the scale insect *Drosicha corpulenta* (Kuwana) (Hemiptera: Coccoidae: Monophlebidae). *Zoologischer Anzeiger*, v. 272, p. 65–72, 2018.

TREMACOLDI, Célia Regina. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, v. 353, 2009.

TUROLLA, Monica Silva dos Reis; NASCIMENTO, Elizabeth de Souza. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p. 289–306, 2006.

VALENTE, Camila Oliveira et al. Popularizando as plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Sul do Brasil. *Cadernos de Agroecologia*, v. 15, n. 2, 2020.

VASCONCELOS, Andréa Guimarães Vieira de et al. Seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius* sp.). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, p. 827–831, 2009.

VERMELHO, Alane Beatriz et al. Enzimas proteolíticas: aplicações biotecnológicas. In: *Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado*, p. 273–287, 2008.

WU, Shu-Jing; LIU, Po-Len; NG, Lean-Teik. Tocotrienol-rich fraction of palm oil exhibits anti-inflammatory property by suppressing the expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 52, n. 8, p. 921–929, 2008.