



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

ANA MÁRJORY PAIVA SOUSA

**PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS NEMATICIDAS EM
SEMENTES DE *Moringa oleifera* PARA O CONTROLE DE ENDOPARASITOSE
EM PEQUENOS RUMINANTES.**

FORTALEZA - CEARÁ

2020

ANA MÁRJORY PAIVA SOUSA

PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS NEMATICIDAS EM
SEMENTES DE *Moringa oleifera* PARA O CONTROLE DE ENDOPARASITÓSES EM
PEQUENOS RUMINANTES.

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Agropecuária.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Sílvio do Egito
Coorientadora: Dra. Hévila Oliveira Salles.

FORTALEZA - CEARÁ

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Sousa, Ana Márjory Paiva.

Prospecção e caracterização de peptídeos nematocidas em sementes de Moringa oleifera para o controle de endoparasitoses em pequenos ruminantes [recurso eletrônico] / Ana Márjory Paiva Sousa. - 2020

Um arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 127 folhas.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Rede Nordeste de Biotecnologia, Doutorado em Biotecnologia, Fortaleza, 2020.

Área de concentração: Biotecnologia em Agropecuária.

Orientação: Prof. Dr. Antônio Sílvio do Egito.

Coorientação: Prof.^a Dra. Hévila Oliveira Salles.

1. Moringa oleifera. 2. Peptídeos . 3. Nematocidas. 4. Ruminantes. 5. Controle integrado.
I. Título.


ANA MÁRJORY PAIVA SOUSA


PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS NEMATICIDAS EM
SEMENTES DE *Moringa oleifera* PARA O CONTROLE DE ENDOPARASITÓSES EM
PEQUENOS RUMINANTES

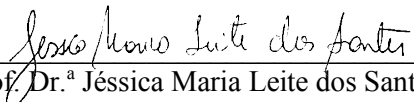
Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Agropecuária.


Aprovada em 23 de junho de 2020


BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Antônio Sílvio do Egito (Orientador)
Embrapa Caprinos e Ovinos - EMBRAPA


Pesq. Dr.ª Hévila Oliveira Salles (Coorientadora)
Embrapa Caprinos e Ovinos - EMBRAPA


Prof. Dr.ª Jéssica Maria Leite dos Santos
Centro Universitário UNINTA


Prof. Dr. José Roberto Viana Silva
Universidade Federal do Ceará - UFC


Prof. Dr. Roberto Cláudio F. Franco Pompeu
Embrapa Caprinos e Ovinos - EMBRAPA


Pesq. Dr. Kirley Marques Canuto
Embrapa Agroindústria Tropical - EMBRAPA

RESUMO

Propriedades anti-helmínticas das sementes de *Moringa oleifera* (moringa) têm sido descritas contra diferentes nematoides gastrintestinais (GI), particularmente sobre *Haemonchus contortus*. Contudo, estudos acerca da identidade dos compostos ativos, bem como, abordagens visando o uso da moringa para o controle alternativo de helmintoses são bastante limitadas. Assim, o objetivo do presente estudo foi prospectar e caracterizar peptídeos nematicidas em sementes de *M. oleifera* e avaliar o uso dessas sementes no controle de endoparasitoses em pequenos ruminantes. As etapas de purificação e identificação de compostos ativos foram bioguiadas por testes de eclosão de ovos *in vitro*, além de ensaios de microfloculação. Extrato aquoso proteico das sementes de moringa foi fracionado através de ultrafiltração em membranas (MWCO 12 e 2 kDa), sendo os peptídeos separados e identificados utilizando técnicas de cromatografia em fase reversa e espectrometria de massa. Para avaliação das sementes em estratégias de controle parasitário, farelo (F-Mo) e torta (T-Mo) de moringa (coprodutos) foram produzidos através de prévia delipidação das sementes com hexano e por prensagem, respectivamente. Em estudo *in vivo*, os efeitos fitoterápicos do F-Mo e de seu extrato aquoso (EAF-Mo) foram avaliados sobre ovinos da raça Santa Inês (n = 36) infectados artificialmente com nematoides GI e mantidos sob dieta de alto concentrado. Utilizando delineamento inteiramente casualizado, os animais foram distribuídos randomicamente em quatro grupos, cada animal recebeu, por via oral, duas doses de Oxfendazol 2,5 mg/Kg (G1); F-Mo 250 mg/Kg (G2); EAF-Mo 250 mg/Kg (G3) e Água - Grupo não tratado (G4). Coletas de sangue e fezes foram realizadas durante 8 semanas de avaliação, sendo os tratamentos administrados nas semanas 0 e 4. Finalmente, usando experimento em casa de vegetação, avaliou-se os efeitos da aplicação de T-Mo no solo em relação à contaminação de forragem por larvas de nematoides. Os resultados deste estudo demonstraram, de forma inédita, a identificação de quatro peptídeos nematicidas a partir das sementes de moringa, denominados de Mo-HLPs 1-4. Multifuncionais, os Mo-HLPs também se mostraram eficientes em reduzir turbidez de água e foram descritos como novos agentes flocculantes da espécie. As análises proteômicas revelaram que Mo-HLPs são moléculas básicas (pI > 10), ricas em cisteínas, com massas entre 4,5 e 4,8 kDa, e com um domínio de ligação à quitina altamente conservado. Buscas no BLAST mostraram que Mo-HLPs pertencem à família de peptídeos hevein-like e apresentam 90% de identidade com morintides de folhas de *M. oleifera*. *In vitro*, Mo-HLPs exibiram eficiências distintas entre as isoformas, onde atividades inibitórias da eclosão de ovos variaram de 73% a 100% enquanto os efeitos flocculantes registrados foram entre 67% e 89%. *In vivo*, frente a excelentes condições

nutricionais, não foi possível observar diferenças clínicas, parasitológicas ou hematológicas entre grupos tratados e não tratado com moringa ($P > 0,05$). A porcentagem média de redução da contagem de ovos nas fezes ao final do estudo foi de 88%, 68%, 52% e 74% para G1, G2, G3 e G4, respectivamente. Valores de volume globular e proteínas plasmáticas totais mantiveram-se dentro da normalidade. No experimento em casa de vegetação, a adição de doses crescentes de T-Mo (0, 12.5, 25 e 50 g) sobre o solo de vasos contendo fezes contaminadas mostrou uma tendência de redução nos níveis de infestação de capim-tanzânia por larvas de nematoides. Tal ação nematicida foi acompanhada de aumentos nos índices relativos de clorofila das plantas. Em conclusão, os peptídeos isolados de moringa (Mo-HLPs) representam um novo grupo de agentes nematicidas com potencial para o desenvolvimento de novas drogas anti-helmínticas; o farelo e a torta das sementes apresentam efeitos nematicidas contra estágios de formas de vida livre de nematoides gastrintestinais e podem ser exploradas como opções interessantes para comporem sistemas integrados de controle parasitário, contribuindo para a sustentabilidade dos processos produtivos.

Palavras-chave: *M. oleifera*. Peptídeos. Nematicidas. Ruminantes. Controle integrado.

ABSTRACT

Anthelmintic properties of *Moringa oleifera* (moringa) seeds have been described against gastrointestinal (GI) nematodes, particularly on *Haemonchus contortus*. However, studies on the identity of the active compounds, as well as on approaches aimed at the use of moringa for the alternative control of helminth infections are quite limited. Thus, the aim of the present study was to prospect and characterize nematicidal peptides in *M. oleifera* seeds and to evaluate the use of these seeds in the control of endoparasites in small ruminants. The stages of purification and identification of active compounds were bioguided by in vitro egg hatching assay, in addition to microfloculation tests. Aqueous protein extract of the moringa seeds was fractionated through membrane ultrafiltration (MWCO 12 and 2 kDa), and the peptides separated and identified using reverse phase chromatography and mass spectrometry techniques. To evaluate the seeds in parasite control strategies, moringa bran (F-Mo) and moringa cake (T-Mo) (coproducts) were produced through previous delipidation of the seeds with hexane and by pressing, respectively. For the in vivo study, the phytotherapeutic effects of F-Mo and its aqueous extract (EAF-Mo) were evaluated on Santa Inês sheep (n = 36) artificially infected with GI nematodes and kept under a high concentrate diet. Using a completely randomized design, the animals were randomly distributed into four groups, each animal received, orally, two doses of Oxafendazole 2.5 mg/Kg (G1); F-Mo 250 mg/Kg (G2); EAF-Mo 250 mg Kg (G3) and Water - untreated group (G4). Blood and fecal collections were performed during 8 weeks of evaluation, with treatments administered at weeks 0 and 4. Finally, using a greenhouse experiment, the effects of applying T-Mo to the soil in relation to forage contamination by nematode larvae were evaluated. The results of this study demonstrated, in an unprecedented way, the identification of four nematicidal peptides from the moringa seeds, called Mo-HLPs 1-4. Multifunctional, Mo-HLPs showed ability to effectively remove turbidity of water and were described as new flocculating agents of the species. Proteomic analyzes revealed that Mo-HLPs are basic molecules (pI > 10), rich in cysteines, with masses between 4.5 and 4.8 kDa, and with a highly conserved chitin-binding domain. Searches in BLAST showed that Mo-HLPs belong to the family of hevein-like peptides and have 90% identity with morintides of *M. oleifera* leaves. In vitro, Mo-HLPs exhibited distinct efficiencies between isoforms, where percent egg hatch inhibition values ranging from 73% to 100% while the flocculating effects recorded were from 67% to 89%. In vivo, due to excellent nutritional conditions, it was not possible to observe clinical, parasitological or hematological differences between groups treated and not treated with moringa (P > 0.05). The reduction percentage of

the fecal egg count was 88%, 68%, 52% and 74% for G1, G2, G3 and G4, respectively. Globular volume values and total plasma proteins remained within the normal range. In the greenhouse experiment, the addition of increasing doses of T-Mo (0, 12.5, 25 and 50 g) on the soil of vase containing contaminated feces, there was a tendency to reduce the levels of tanzânia grass infestation by nematode larvae. Such nematicidal action was accompanied by increases in the relative chlorophyll index of plants. In conclusion, the peptides isolated from moringa (Mo-HLPs) represent a new group of nematicidal agents with the potential for the development of new anthelmintic drugs; the bran and the seed cake have nematicidal effects against stages of life forms free of gastrointestinal nematodes and can be explored as interesting options to compose integrated systems of parasitic control, contributing to the sustainability of the production processes.

Keywords: *M. oleifera*. Peptides. Nematicides. Ruminants. Integrated control.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Distribuição global de <i>Moringa oleifera</i> | 21 |
| Figura 2 - Estruturas morfológicas de <i>Moringa oleifera</i> | 23 |
| Figura 3 – Processo de coagulação/floculação via neutralização de cargas | 29 |
| Figura 4 – Ciclo biológico do endoparasito <i>Haemonchus contortus</i> | 36 |
| Figura 5 - Fluxograma do procedimento de extração e fracionamento de proteínas das sementes de <i>M. oleifera</i> | 49 |
| Figura 6 - Beneficiamento de sementes de <i>Moringa oleifera</i> para avaliação de efeitos fitoterápicos <i>in vivo</i> | 58 |
| Figura 7 - Ovinos Santa Inês utilizados no experimento. | 59 |
| Figura 8 - Delineamento experimental para avaliação <i>in vivo</i> de atividade anti-helmíntica das sementes de <i>M. oleifera</i> | 61 |
| Figura 9 - Preparo e administração dos tratamentos. | 62 |
| Figura 10 – Preparação dos vasos para realização do experimento em casa de vegetação. | 65 |
| Figura 11 - Poda e adubação química do capim-tanzânia aos 56 dias após semeadura. . | 65 |
| Figura 12 - Contaminação do solo com fezes contendo ovos de nematoides GI | 66 |
| Figura 13 - Adição de Torta de Moringa ao solo contaminado. | 67 |
| Figura 14 - Distribuição dos vasos em casa de vegetação. | 68 |
| Figura 15 - Capim-tanzânia ao final do estudo: medição do IRC e coleta da parte aérea total das plantas. | 69 |
| Figura 16 - Recuperação de larvas a partir da parte aérea do capim-tanzânia. | 70 |
| Figura 17 - Caracterização eletroforética de proteínas de sementes de <i>Moringa oleifera</i> | 73 |
| Figura 18 - Atividade floculante (A) e atividade inibitória da eclosão de ovos (B) da fração D > 2. | 73 |
| Figura 19 - Purificação de Mo-HLPs por RP-HPLC. | 74 |
| Figura 20 - Espectros de massa deconvoluídos dos Mo-HLPs obtidos em modo íon positivo e analisados entre faixas de massa de 200 e 2500 m/z. | 75 |
| Figura 21 - Espectros MALDI-MS dos Mo-HLP 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D) usando 1,5-diaminonaftaleno (1,5-DAN) como matriz. | 77 |
| Figura 22 - Perfil MALDI-TOF-MS de Mo-HLP3 em estado nativo (A), reduzido com DTT 200 mM (B) e S-alquilado com IAA 500 mM (C). | 78 |

| | |
|--|------------|
| Figura 23 - Espectros de fragmentação MALDI-TOF-MS/MS dos íons m/z 2235,5 [M + H]⁺ (A) e m/z 1309 [M + H]⁺ (B) obtidos após digestão de Mo-HLP3 por tripsina. | 81 |
| Figura 24 - Estruturas 3D de mO1 e Mo-HLPs de <i>Moringa oleifera</i>. | 84 |
| Figura 25 - Comparações estruturais entre mO1 e Mo-HLP3 (A) e entre Mo-HLPs (B e C)..... | 85 |
| Figura 26 - Atividade floculante (A) e atividade inibitória da eclosão de ovos (B) de Mo-HLPs isolados das sementes de <i>M. oleifera</i>. | 87 |
| Figura 27 - Avaliação dos efeitos anti-helmínticos <i>in vitro</i> do EAF-Mo..... | 88 |
| Figura 28 - Ganho de peso (A), Escore corporal (B) e Ingestão voluntária de alimento (C) de cordeiros infectados com nematoides GI, tratados e não tratados com <i>Moringa oleifera</i>. | 90 |
| Figura 29 - Número médio de ovos por grama de fezes - OPG (A) e Número de L3 total obtidas através de minicoproculturas (B) de cordeiros infectados com nematoides GI, tratados e não tratados com <i>Moringa oleifera</i>..... | 92 |
| Figura 30 - Valores de volume globular-VG (A) e Proteínas plasmáticas totais-PPT (B) de cordeiros infectados com nematoide GI, tratados e não tratados com <i>Moringa oleifera</i>. | 93 |
| Figura 31 - Curva dose-resposta obtida através de minicoproculturas para atividade nematicida da T-Mo..... | 95 |
| Figura 32 - Número de larvas recuperadas da parte aérea do capim-tanzânia em função de doses de T-Mo no solo. | 96 |
| Figura 33 - Índice relativo de clorofila das folhas de capim-tanzânia em função de doses de T-Mo no solo..... | 97 |
| Figura 34 - Arranjo esquemático de precursores biosintéticos de peptídeos hevein-like. | 101 |
| Figura 35 - Sequência logo de 8C-HLPs incluindo morintides..... | 101 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----------|
| Tabela 1 - Estudos relacionados a propriedades anti-helmínticas de <i>Moringa oleifera</i>. | 40 |
| Tabela 2 - Composição químico-bromatológica dos principais ingredientes da dieta experimental de alto concentrado (DAC) e dos produtos do processamento das sementes de <i>Moringa oleifera</i> | 62 |
| Tabela 3 - Sequências parciais de Mo-HLPs obtidas através da técnica de MALDI com fragmentação direta na fonte (MALDI-ISD)..... | 78 |
| Tabela 4 - Sequências peptídicas obtidas por MALDI-MS/MS dos fragmentos trípticos gerados a partir da digestão de Mo-HLP3..... | 79 |
| Tabela 5 - Alinhamento da sequência parcial de Mo-HLP3 com domínios maduros de outros peptídeos 8C-hevein-like. | 82 |
| Tabela 6 - Média do ganho de peso dos grupos experimentais alimentados com dieta de alto concentrado (DAC) durante 60 dias..... | 91 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|---|
| Abs | Absorbância |
| ANOVA | Análise de variância |
| CHAPS | 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate |
| D < 12 | Fração não retida em membrana de diálise MWCO 12 kDa |
| D < 2 | Fração não retida em membrana de diálise MWCO 2 kDa |
| D > 12 | Fração retida em membrana de diálise MWCO 12 kDa |
| D > 2 | Fração retida em membrana de diálise MWCO 2 kDa |
| DAN | 1,5-diaminonaphthalene |
| DTT | Ditiotreitol |
| EA | Extrato Aquoso |
| EAF-Mo | Extrato Aquoso do Farelo de <i>Moringa oleifera</i> |
| EDTA | Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilenodiamino tetra-acético). |
| F-Mo | Farelo de <i>Moringa oleifera</i> |
| GI | Gastrintestinais |
| HLPs | Hevein-like Peptides (Peptídeos Hevein-like) |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência) |
| IAA | Iodoacetamida |
| IPG | Immobilized pH Gradient (Gradiente de pH imobilizado) |
| IRC | Índice relativo de clorofila |
| ISD | In-Source-Decay (Fragmentação direta na fonte) |
| kDa | Kilodaltons |
| MALDI | Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization (Ionização e dessorção a laser assistida por matriz) |
| mAU | Mili unidades de absorbância |
| Mo-HLPs | Peptídeos Hevein-like de <i>Moringa oleifera</i> |
| MS | Mass Spectrometry (Espectrometria de massa) |
| MWCO | Molecular Weight Cut-Off (Peso molecular de corte) |
| p/v | peso/volume |
| RP-HPLC | Reversed phase HPLC (HPLC de fase reversa) |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulfate – Polyacrylamide gel electrophoresis (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio). |

| | |
|------|---|
| TFA | Trifluoroacetic acid (Ácido trifluoroacético) |
| T-Mo | Torta de <i>Moringa oleifera</i> |
| TOF | Time of Flight (Tempo de vôo) |
| v/v | volume/volume |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 17 |
| 2.1 | Biotecnologia e prospecção de recursos naturais | 17 |
| 2.2 | Plantas como recursos biotecnológicos | 19 |
| 2.3 | Moringa oleifera Lamarck | 20 |
| 2.3.1 | Nomenclatura, origem e distribuição geográfica | 20 |
| 2.3.2 | Taxonomia e descrição botânica | 21 |
| 2.3.3 | Valor biotecnológico da <i>Moringa oleifera</i> | 23 |
| 2.4 | Moringa e o processo coagulante/floculante | 27 |
| 2.5 | Moringa e o cenário de verminoses em pequenos ruminantes | 32 |
| 2.5.1 | Helmintoses gastrintestinais | 32 |
| 2.5.2 | Haemonchus contortus | 35 |
| 2.5.3 | Estratégias de controle e perspectivas futuras | 37 |
| 2.5.4 | Atividade anti-helmíntica e potencial fitoterápico de moringa | 38 |
| 2.5.5 | Manejo de pastagem no controle das helmintoses GI | 42 |
| 3 | JUSTIFICATIVA | 44 |
| 4 | HIPÓTESES CIENTÍFICAS | 45 |
| 5 | OBJETIVOS | 46 |
| 5.1 | Geral | 46 |
| 5.2 | Específicos | 46 |
| 6 | MATERIAIS E MÉTODOS | 47 |
| 6.1 | Local de realização do estudo | 47 |
| 6.2 | Material vegetal | 47 |
| 6.3 | Animais Experimentais | 47 |
| 6.4 | Purificação, isolamento e identificação de peptídeos ativos | 48 |
| 6.4.1 | Extração e obtenção de frações proteicas | 48 |
| 6.4.2 | Caracterização por eletroforese | 50 |
| 6.4.3 | Purificação em cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC) | 51 |
| 6.4.4 | Análises por espectrometria de massa e sequenciamento de Mo-HLPs | 51 |
| 6.5 | Análises de bioinformática | 52 |
| 6.6 | Predição <i>in silico</i> das estruturas tridimensionais de Mo-HLPs | 53 |
| 6.6.1 | Modelagem por homologia | 53 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 6.7 | Testes de atividades <i>in vitro</i> | 55 |
| 6.7.1 | Teste de atividade flocculante | 55 |
| 6.7.2 | Atividade anti-helmíntica | 55 |
| 6.8 | Atividade anti-helmíntica <i>in vivo</i> | 58 |
| 6.8.1 | Preparo do material vegetal avaliado como fitoterápico | 58 |
| 6.8.2 | Tratamento e Manejo alimentar | 59 |
| 6.8.3 | Exames clínicos: peso, escore de condição corporal e grau FAMACHA [®] | 63 |
| 6.8.4 | Exames parasitológicos: contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e coprocultura | 63 |
| 6.8.5 | Exames hematológicos: volume globular (VG) e proteínas plasmáticas totais (PPT) ... | 64 |
| 6.9 | Atividade de moringa utilizando a ECONEMAT[®] | 64 |
| 6.10 | Análises estatísticas | 70 |
| 7 | RESULTADOS | 72 |
| 7.1 | PARTE I – Purificação e isolamento de peptídeos ativos | 72 |
| 7.1.1 | Extração e caracterização de frações proteicas das sementes de moringa | 72 |
| 7.1.2 | Isolamento e identificação de Mo-HLPs | 74 |
| 7.1.3 | Determinação da estrutura primária dos Mo-HLPs | 76 |
| 7.1.4 | Determinação do número de cisteínas | 76 |
| 7.1.5 | Estrutura tridimensional de Mo-HLPs | 83 |
| 7.1.6 | Testes de atividades com Mo-HLPs | 86 |
| 7.2 | PARTE II – Utilização de moringa no controle de nematoides GI | 88 |
| 7.2.1 | Avaliação <i>in vitro</i> do material vegetal usado como fitoterápico | 88 |
| 7.2.2 | Atividade anti-helmíntica <i>in vivo</i> | 89 |
| 7.2.3 | Efeito da T-Mo sobre o desenvolvimento das fases de vida livre de nematoides GI | 94 |
| 7.2.4 | Efeitos da T-Mo sobre o solo de forragem cultivada em vasos | 95 |
| 8 | DISCUSSÃO | 98 |
| 8.1 | Identificação e atividades <i>in vitro</i> de Mo-HLPs | 98 |
| 8.2 | Utilização de moringa no controle de nematoides GI | 104 |
| 9 | CONCLUSÕES | 109 |
| 10 | PERSPECTIVAS | 110 |
| | REFERÊNCIAS | 111 |
| | APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO | 126 |
| | APÊNDICE B - REGISTRO DE SEQUÊNCIA EM BASE DE DADOS | 127 |

1 INTRODUÇÃO

Plantas são produtos naturais de importante valor terapêutico e guardam em suas composições uma variedade incalculável de compostos ativos capazes de tratar e prevenir várias doenças e infecções em humanos e animais (YUAN et al., 2016). Atualmente, o uso da medicina tradicional baseada no uso de plantas vem sendo cada vez mais incentivado na medicina veterinária (etnoveterinária) em virtude não apenas de eficácias promissoras, mas também buscando atender uma demanda pela busca de tratamentos alternativos mais sustentáveis (BAKARE et al., 2020). Além disso, sabe-se que o valor terapêutico dos produtos naturais pode ser otimizado a partir da identificação e isolamento dos princípios ativos, permitindo ações mais seletivas ou servindo de inspiração para produção de fármacos biossintéticos (CARVALHO; FERREIRA, 2013).

Dentre diversas propriedades farmacológicas de relevância clínica, plantas com efeitos anti-helmínticos vêm despertando especial interesse na área de pesquisas etnoveterinárias, uma vez que infecções helmínticas são problemas recorrentes e de difícil controle. Nesse contexto, o setor de criação de pequenos ruminantes destaca-se como um importante foco de pesquisa, pois o acometimento dos rebanhos caprinos e ovinos por helmintoses gastrintestinais é um problema onipresente e afeta severamente a saúde, o bem-estar e o desempenho produtivo dos animais (CHARLIER et al., 2017). Embora eficiente, o tratamento convencional das infecções a partir da utilização de quimioterápicos vem tornando-se bastante limitado diante do rápido surgimento de resistência às drogas disponíveis. Ademais, existem várias outras desvantagens ligadas a essa prática, das quais se pode citar o aumento dos custos na produção, proveniente da constante aquisição de fármacos, bem como prejuízos ligados à saúde e ao meio ambiente, decorrentes da grande proporção de resíduos químicos gerados (CASELANI, 2014).

Hoje, preconiza-se a adoção de sistemas de controle integrados que visam a diminuição do uso das drogas sintéticas (MOLENTO; BRAZ, 2017). Dentre as várias alternativas de controle propostas, o uso de fitoterápicos (BORGES; BORGES, 2016) e de estratégias para descontaminação do ambiente (SALLES et al., 2019; VELDE; CHARLIER; CLAEREBOU, 2018), estão entre as mais promissoras.

Em meio a biodiversidade vegetal, *Moringa oleifera* (moringa) é uma planta que ganhou notoriedade mundial em virtude do seu uso múltiplo e da rara composição fitoquímica, sendo uma importante fonte de compostos ativos. As sementes, em particular, são dotadas de características que favorecem um amplo aproveitamento de seus constituintes. Abundantes em óleo de alta qualidade, as sementes de moringa tornaram-se matrizes em potencial para

produção de biodiesel, tendo sido verificado que os resíduos resultantes da extração do óleo (tortas e farelos) são ricos em biocomponentes, incluindo alto teor de proteínas ativas. Pesquisas têm demonstrado o enorme valor agregado à tais resíduos proteicos, com relatos de uso como adubos, aditivos alimentares e, principalmente, como eficientes coagulantes. Na verdade, moringa é conhecida por ser uma referência em tecnologias ecológicas voltadas para tratamento sustentável de águas, devido as suas propriedades coagulantes/floculantes (VILLASEÑOR-BASULTO et al., 2018), mas também é amplamente descrita como uma planta capaz de prevenir e/ou tratar centenas de doenças. Dentre as propriedades terapêuticas da moringa, há vários relatos acerca dos seus efeitos anti-helmínticos. Porém, embora tenha sido descrita a ação da planta sobre diferentes espécies de nematoides, pouco se conhece acerca da identidade dos agentes ativos, sendo os compostos provenientes do metabolismo secundário vegetal os mais citados nas avaliações de composição fitoquímica (CABARDO; PORTUGALIZA, 2017; PAIKRA; DHONGADE; GIDWANI, 2017; TAYO et al., 2014). Estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, onde foi avaliada a atividade anti-helmíntica de moringa sobre a eclodibilidade de ovos de nematoides gastrintestinais de caprinos, revelou que os agentes mais ativos estavam concentrados em uma fração do extrato aquoso das sementes contendo moléculas com massa inferior a 12 kDa. Os resultados encontrados sugeriram que moléculas de natureza proteica, incluindo peptídeos floculantes, eram candidatas bastante prováveis de estarem entre os agentes nematicidas (SALLES et al., 2014a).

Diante do cenário exposto, o presente estudo foi conduzido baseado na prospecção de peptídeos nematicidas visando possíveis aplicações biotecnológicas para sementes de moringa, de modo a viabilizar seu uso no controle integrado de helmintoses. Assim, os resultados obtidos encontram-se descritos em duas partes principais: a primeira (I) diz respeito à identificação e isolamento de novos peptídeos encontrados nas sementes de moringa que apresentaram funções múltiplas, atuando como agentes nematicidas e floculantes. Esta etapa, considerada básica, tem extrema importância no sentido de auxiliar no entendimento dos possíveis mecanismos envolvidos com as propriedades exibidas pelas moléculas. Além disso, suporta a possibilidade de estudos futuros visando a biossíntese de fitofármacos. Já a segunda parte (II) refere-se às investigações para avaliar a eficácia fitoterápica *in vivo* de extratos das sementes, assim como descreve as análises realizadas para avaliar o potencial de utilização das sementes como uma estratégia para interromper o ciclo de vida dos parasitos no ambiente, simulando sua aplicação no solo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biotecnologia e prospecção de recursos naturais

Os princípios dos processos biotecnológicos remontam à antiguidade tendo sido iniciados a partir da domesticação de plantas e animais, assim como pela utilização de processos fermentativos a mais de 6.000 a.C (ROGERS, 2019). As constantes mudanças e desenvolvimento de novas tecnologias culminaram com a chegada da chamada biotecnologia “moderna”, uma classificação relativamente recente surgida nas décadas de 60 e 70 que foi marcada pela tecnologia do DNA recombinante (FALEIRO; ANDRADE, 2011; MALAJOVICH, 2016). Dentre as várias definições propostas para o termo biotecnologia uma delas é descrita de forma bastante abrangente como sendo uma atividade baseada em conhecimentos multidisciplinares, que utiliza agentes biológicos para desenvolver produtos úteis ou solucionar problemas (MALAJOVICH, 2016).

Considerada hoje um setor em enorme expansão, a biotecnologia consolidou-se no mundo inteiro com registros de benefícios em diversos segmentos, sendo vista como aliada da humanidade, seja para produção do novo, seja para viabilizar diferentes formas de reaproveitamento dos recursos naturais. Resultante de uma fusão multidisciplinar que contempla uma rede complexa de conhecimentos, a biotecnologia tem oferecido soluções inovadoras em diversas áreas. Na saúde, destacam-se o desenvolvimento de alimentos funcionais (MORAES et al., 2018), o controle de doenças e a produção de biofármacos (AFZAL et al., 2016; BALKE; ZELTINS, 2019; CHAROONNART; PURTON; SAKSMERPROME, 2018). No meio ambiente, contribui para redução de impactos apresentando soluções mais sustentáveis (AUSTIN et al., 2018; VENDRUSCOLO; FERREIRA; ANTONIOSI FILHO, 2017). Na agropecuária, promove aumento de produção e de qualidade de alimentos (SALOMON; SESSA, 2012; WAN; XUE; YI-PING, 2017; YING et al., 2018). De modo geral, a biotecnologia tem contribuído para obtenção de processos de fabricações industriais mais seguros, eficientes e menos poluentes (KILBANE, 2016; MUSTAFA et al., 2018).

Embora vivenciando o auge da biotecnologia moderna que emprega técnicas de engenharia genética para criação de seres vivos “inéditos” obtidos por técnicas não naturais de seleção, edição gênica e otimização fisiológica, as técnicas da biotecnologia clássica ou tradicional ainda representam importantes ferramentas para o desenvolvimento de inovação tecnológica, na qual utilizam-se como fontes de estudos os seres vivos essencialmente como

encontrados na natureza. Uma vez tendo como ponto de partida qualquer sistema biológico (animais, fungos, bactérias, vegetais), a biotecnologia possui uma biblioteca gigantesca de matrizes para estudo, onde cada uma guarda coleções de compostos naturais de alta complexidade química e estrutural.

Investigar o arsenal químico da natureza e conhecer a relação entre estrutura e propriedades biológicas, por exemplo, fazem parte da missão da química farmacêutica que através da química medicinal investiga e modifica estruturas moleculares naturais com o objetivo de otimizar sua utilização terapêutica. Calcula-se que entre 60 e 70% dos fármacos vendidos como produtos de síntese baseiam-se nesse princípio (CARVALHO; FERREIRA, 2013). No entanto, vale ressaltar que mesmo diante dos avanços tecnológicos um caminho bastante dispendioso deve ser percorrido desde a descoberta de novos compostos, síntese, até que estes consigam transpor etapas pré-clínicas e clínicas para enfim atingir o mercado na forma de medicamento ou produto (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; VIEGAS JR; BOLZANI, 2006).

A perda de eficiência de produtos de mercado e a busca por alternativas sustentáveis são alguns dos fatores que impulsionam estudos de bioprospecção. De acordo com Berlinck (2012), a bioprospecção deve incluir no seu sentido mais amplo a descoberta, descrição, o potencial de utilização dos organismos vivos, e ainda como estes se relacionam com o meio, uma vez que a partir da interação com o ambiente ocorrem alterações na expressão de seu metabolismo. Nesse sentido, pesquisas científicas voltadas à busca de soluções a partir da biodiversidade química seguem alguns fundamentos básicos. A etapa inicial é geralmente marcada pela definição dos alvos que representam o problema a ser resolvido, como um parasito, uma deficiência funcional do organismo ou mesmo uma característica especial de um novo biomaterial. Em seguida, é imprescindível considerar a disponibilidade da fonte de substâncias naturais, que pode ser representada por coleções de determinada planta, por exemplo. Tão importante quanto os parâmetros citados acima, está a necessidade de capacitação técnica e científica que permitirão a detecção, isolamento e análise biológica das moléculas ativas (CARVALHO; FERREIRA, 2013). Após uma sucessão de etapas de fracionamento químico, sempre guiadas pela verificação da atividade de cada fração sobre o alvo, o resultado final tende a ser uma molécula, ou uma mistura de poucas moléculas, eficientes em resolver o propósito inicial, e uma vez conhecida a estrutura do composto natural ativo, este poderá ser utilizado como tal, ou inspirar a síntese de novas moléculas de interesse científico e industrial (CARVALHO; FERREIRA, 2013). Em geral, os bioativos são moléculas pequenas capazes de desempenhar determinados

efeitos terapêuticos em virtude de interações específicas com biomacromoléculas ou receptores (VIEGAS JR; BOLZANI, 2006).

2.2 Plantas como recursos biotecnológicos

Geneticamente mais complexas que outros organismos vivos, a maioria das plantas podem oferecer uma vasta gama de compostos exclusivos que são capazes de beneficiar de diversas maneiras tanto o homem quanto outros animais (CARVALHO; FERREIRA, 2013). A biodiversidade vegetal sempre despertou interesse para estudos de explorações tecnológicas, constituindo uma matéria-prima abundante e de valor incalculável. Historicamente, a humanidade veio mostrando interações multimilenares com plantas, utilizando-as particularmente como forma de aliviar e tratar enfermidades (VIEGAS JR; BOLZANI, 2006; YUAN et al., 2016).

Devido a uma série de fatores como acessibilidade, insatisfação com medicamentos alopáticos, consciência ecológica e até mesmo religião, produtos naturais com propriedades terapêuticas permanecem entre as opções de uso em sistemas de saúde/doença. Sociedades modernas de muitos países, incluindo o Brasil, ainda contam com o tradicional uso da chamada medicina alternativa baseada no uso de plantas medicinais (FERREIRA et al., 2014). Hoje, o saber acumulado ao longo do tempo associado ao desenvolvimento tecnológico vem possibilitando uma nova realidade terapêutica onde plantas continuam sendo importantes no descobrimento de novas drogas.

A prática da chamada fitoterapia, cuja eficácia decorre de ações combinadas dos diferentes constituintes vegetais, está associada a inúmeros benefícios trazidos principalmente para área de medicina humana (YUAN et al., 2016), porém observa-se que essa prática também vem sendo incentivada na medicina etnoveterinária, podendo ser empregada nos cuidados com a saúde e criação de animais, agregando valores com a produção orgânica e proteção ambiental (BAKARE et al., 2020; PISSERI et al., 2013). Na área veterinária, dentre as indicações gerais, destacam-se usos para tratamento de infecções parasitárias, principalmente helmínticas, além de usos como anti-inflamatório e repelentes (SILVA et al., 2013).

As abordagens fitoterápicas podem ser aleatórias ou ainda orientadas a partir de levantamentos etnobotânicos e etnofarmacológicos, onde uma seleção guiada de plantas constitui um atalho importante para iniciar os estudos de bioprospecção. Em plantas, os registros de bioativos estão frequentemente associados a compostos do metabolismo secundário

(VALLI et al., 2012; WINK, 2015) e a proteínas e peptídeos (CÂNDIDO et al., 2014; SÁNCHEZ; VÁZQUEZ, 2017; WEIDMANN; CRAIK, 2016).

2.3 *Moringa oleifera* Lamarck

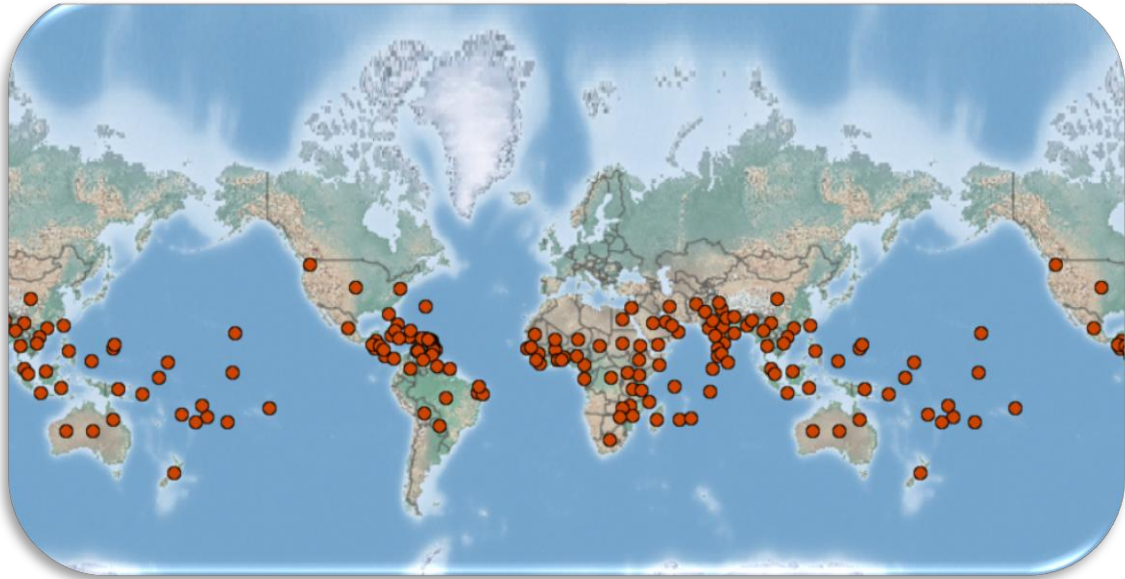
2.3.1 Nomenclatura, origem e distribuição geográfica

Moringa oleifera Lam. é o nome científico da espécie vegetal conhecida popularmente como “moringa”. No entanto, várias denominações internacionais têm sido bastante difundidas com grande destaque para os termos ingleses “drumstick tree” (árvore de baqueta) e “horse radish tree” (árvore de rábano ou rabanete) que estão associados, respectivamente, ao formato dos frutos e ao sabor picante das raízes. No Brasil os termos mais conhecidos são acácia branca, quiabo-de-quina e morigueiro.

No que tange a origem exata da planta, há relatos divergentes sobre o assunto e em meio a informações conflitantes considera-se como hipótese mais provável que a espécie *M. oleifera* seja possivelmente nativa do noroeste da Índia, onde foram encontradas evidências de espécimes selvagens da planta (OLSON, 2017). Considerada uma importante cultura tropical que apresenta baixas exigências nutricionais, além de boa adaptação a diferentes climas e solos, atualmente, a moringa encontra-se amplamente distribuída em todas as regiões tropicais e subtropicais tendo sido introduzida e cultivada em pelo menos setenta países (**Figura 1**), principalmente nos subdesenvolvidos (GODINO; ARIAS; IZQUIERDO, 2017).

O cultivo de moringa depende, principalmente, de fatores como temperatura e umidade. Temperaturas com médias diárias na faixa de 25 a 35 °C são consideradas boas para espécies do gênero *Moringa*, uma vez que toleram bem temperaturas elevadas. Contudo, em temperaturas inferiores a 20 °C podem ser observadas reduções significativas de crescimento ou mesmo o total impedimento deste quando abaixo de 10 °C, sendo, portanto, bastante sensíveis a geadas o que restringe sua distribuição para muito além do cinturão tropical. Além disso, moringa não suporta solos encharcados e compactos, adaptando-se melhor em áreas que recebem menos de 1,5 m de chuva por ano e onde os solos sejam mais arenosos (OLSON, 2017; RADOVICH, 2011).

Figura 1 - Distribuição global de *Moringa oleifera*.



Fonte: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/34868>

Há relatos de que a moringa tenha chegado ao Brasil por volta da década de 50. Registros de ocorrência da espécie nos dias atuais revelam sua presença em diversos estados do país como Rio Grande do Norte, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Paraná (SANTOS; MOURA; LIMA, 2016). A rusticidade da planta favoreceu seu cultivo, principalmente, em áreas da região nordeste do país (SOUTO; JÚNIOR, 2018). No entanto, a exploração de moringa nessa região ocorre majoritariamente em áreas de pequenos produtores e carece de aplicações tecnológicas que poderiam contribuir para melhores condições de cultivo e aproveitamento, uma vez que se trata de uma espécie cujo potencial para promoção de recursos e renda para população é bastante alto (SOLTO; SOUSA, 2018).

2.3.2 Taxonomia e descrição botânica

Taxonomicamente, *Moringa oleifera* Lamarck é classificada da seguinte maneira (PALADA, 2019):

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Brassicales

Família: Moringaceae

Gênero: Moringa

Espécie: *Moringa oleifera* Lam.

Moringa oleifera é uma das 13 espécies de angiospermas que constituem o único gênero da ordem Brassicales, *Moringa* (FALOWO et al., 2018). Devido à diversidade fenotípica, essas espécies monogenéricas foram categorizadas em três grupos baseados em dados filogenéticos e morfologia de tronco. Quatro delas apresentam tronco inchado característico para o armazenamento de água e foram denominadas árvores garrafa (“bottle tree”). Outras seis, são pequenas árvores ou arbustos de diferentes hábitos, mas nesse caso as raízes carnudas é que atuam como reservatório de água (“tuberous”). E as três espécies restantes, dentre as quais encontra-se *M. oleifera*, apresentam um tronco delgado mais convencional e raízes fibrosas e resistentes (“slenders”) (OLSON, 2002).

Considerada uma planta de porte médio, *Moringa oleifera* é de fácil propagação, apresenta um crescimento rápido e pode atingir de 10 a 12 m de altura. Perene ou decídua, possui uma copa larga com típico formato de guarda-chuva. O tronco, de madeira leve, é coberto por uma casca cinza esbranquiçada e cercada por cortiça espessa. As folhas são grandes (25-60 cm) e de coloração verde-clara, compostas bipinadas ou tripinadas com sete folíolos pequenos em cada pina. As flores são perfumadas, bissexuais, e de coloração branco-creme estando arranjadas em inflorescência do tipo panícula com 8-30 cm de comprimento. Os frutos são vagens pendulares e trilobadas medindo, geralmente, entre 18 e 50 cm de comprimento. Quando jovens apresentam coloração verde tornando-se marrons com o amadurecimento. São deiscentes e em seus interiores encontram-se numerosas sementes de formato subgloboso ou ligeiramente triangulares. As sementes apresentam tegumento marrom-escuro e finas asas esbranquiçadas em cada um de seus três ângulos (**Figura 2**). Após a retirada desse tegumento são obtidas amêndoas com diâmetro de aproximadamente 1 cm, formadas por uma massa clara e oleosa (NAVIE; CSURHES, 2010; PARROTTA, 2014).

Figura 2 - Estruturas morfológicas de *Moringa oleifera*.



A- Hábito arbóreo. B- Caule. C- Flor. D- Folhas e frutos verdes e maduros. E- Sementes.
Fonte: Elaborada pela autora.

2.3.3 Valor biotecnológico da *Moringa oleifera*

A moringa é uma planta considerada de uso múltiplo, comumente chamada de árvore do bem, da qual tudo se aproveita. Dentre diversas aplicações, a moringa destaca-se pelo seu alto valor nutricional, medicinal, além de inúmeras utilidades comerciais (FALOWO et al., 2018; KOU et al., 2018).

Todas as partes da moringa podem ser consumidas como alimento. Do ponto de vista nutricional, as grandes quantidades e variedade de fitoquímicos na moringa tornam essa planta uma importante aliada no combate à desnutrição. Fonte abundante de proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas, cálcio, ferro, potássio e outros minerais essenciais, fazem a moringa ser utilizada em muitos países como suplemento dietético para tratar problemas relacionados às deficiências alimentares, uma realidade ainda presente em comunidades carentes ao redor do mundo (DHAKAR et al., 2011; GUPTA et al., 2017). Estudos envolvendo o desenvolvimento de produtos alimentares funcionais através da incorporação da moringa nas suas composições mostram bons resultados tanto para as avaliações de análises sensoriais, quanto relacionados a um melhor aporte nutricional e nutracêutico, gerando alimentos com maiores quantidade de compostos fenólicos, betacarotenos, proteínas e lipídeos (ALUKO; BRAI; ADELORE, 2013;

OWUSU; ODURO; ELLIS, 2011), o que demonstra o potencial de exploração da planta pela indústria alimentícia.

E além das muitas possibilidades de uso na dieta humana, diversos estudos vêm apontando vantagens da inclusão da moringa também na alimentação animal. A nutrição de ruminantes tem sido o foco de muitas pesquisas, onde a moringa é destacada como uma rica fonte de proteína com composição balanceada de seus aminoácidos e de fibra de boa qualidade, que se transforma em energia no rúmen (LISITA; JULIANO; MOREIRA, 2018; SOLTAN et al., 2017). Em substituição ao feno de alfafa, o uso da moringa na dieta de ovelhas possibilitou maior produção e qualidade do leite, com melhoria do estado oxidativo para leite e soro (BABIKER et al., 2016). A avaliação de coprodutos da indústria do biodiesel para uso na dieta de ruminantes revelou que a torta de moringa influencia na redução da emissão de gases poluentes ao meio ambiente e melhora o aproveitamento energético pelos ruminantes (MEDEIROS et al., 2015). Os estudos sugerem que proteínas catiônicas e metabólitos secundários presentes em moringa são os responsáveis por interações com metanógenos e outros microrganismos da flora intestinal de ruminantes, de modo a influenciarem na regulação da função metabólica microbiana e emissões de metano (DONG; ZHANG; DIAO, 2019; MEDEIROS et al., 2015). O elevado teor proteico de moringa a faz uma alternativa com boa viabilidade para compor rações concentradas de qualidade, substituindo com sucesso ingredientes tradicionais, como o farelo de soja e de milho (MEDEIROS et al., 2015).

Oleifera é um termo latino que significa "contendo óleo". O óleo extraído das sementes de moringa varia num teor entre 25 a 41%, de acordo com o processo extrativo (PEREIRA et al., 2018). Trata-se de um óleo de excelente qualidade, comestível, resistente ao ranço e que apresenta quantidades substanciais de ácido oleico, esteróis e tocoferóis, podendo ser utilizado na culinária em substituição ao azeite de oliva (FRIGHETTO et al., 2007). Por apresentar propriedades únicas, o aproveitamento industrial e biotecnológico do óleo de moringa é bastante diverso. Pesquisas têm levado a criações de linhas de cosméticos e produtos de cuidados pessoais de saúde, como xampu, sabonete, perfumes e cuidados com a pele, todos a base de óleo de moringa (PALADA, 2017). Outros empregos para o óleo incluem a utilização em tintas, lubrificantes e produção de biodiesel (PALADA, 2017; PEREIRA et al., 2018; SHARMA et al., 2009). Uma pesquisa brasileira mostrou que o biodiesel de moringa apresenta uma estabilidade oxidativa superior quando comparada à maioria dos combustíveis produzidos a partir de outras fontes (FERNANDES et al., 2015). Logo, moringa é uma candidata em potencial na lista de matérias-primas para indústria de biocombustíveis que vive um momento de expansão.

Após a retirada do óleo das sementes são geradas as chamadas tortas e/ou farelos residuais. O termo torta refere-se ao produto resultante de processos de extração mecânica do óleo, enquanto o termo farelo é usado quando o óleo é extraído utilizando solventes químicos orgânicos (SANTOS, 2011). Apesar de serem considerados subprodutos, esses materiais são ricos em biocomponentes com propriedades e eficiências para várias aplicações. Dentre as destinações para a torta de moringa, por exemplo, pode-se destacar o uso como biofertilizante (EMMANUEL et al., 2011), como aditivo alimentar altamente proteico (MEDEIROS et al., 2015) e como fonte de coagulantes naturais para tratamento de diversos tipos de água (ALI et al., 2010; BAPTISTA et al., 2017). As propriedades para tais aplicações se devem principalmente às coleções de proteínas e minerais que permanecem ativos nas sementes após o processo de delipidação.

Já na medicina, *Moringa oleifera* é vista como uma panaceia, capaz de ser usada no tratamento de centenas de doenças (GOPALAKRISHNAN; DORIYA; KUMAR, 2016). A utilização de moringa para prevenção e tratamento de diversas patologias é uma prática bastante antiga, onde todas as partes da planta são descritas por apresentarem alguma atividade terapêutica específica (MAHMOOD; MUGAL; HAQ, 2010). Moringa tem sido empregada no tratamento de enfermidades incluindo desintérias, infecções de pele, tosse, artrite, reumatismo, asma, inflamações, doenças parasitárias, musculares, hipertensão, diabetes e etc (ABD RANI; HUSAIN; KUMOLOSASI, 2018; FAHEY, 2005; POPOOLA; OBEMBE, 2013). O uso da moringa é feito quase sempre na forma de extratos preparados de diferentes maneiras. Sementes e folhas são os tecidos mais utilizados. As sementes por serem órgãos de reserva abrigam uma grande quantidade e variedade de fitoconstituintes, e as de moringa caracterizam-se principalmente pelo elevado teor de proteínas e lipídeos, além de serem boas fontes de flavonoides, carboidratos, compostos fenólicos, glicosinolatos, alcaloides, esteróis e outros (ABD RANI; HUSAIN; KUMOLOSASI, 2018; BRILHANTE et al., 2017; GALLÃO; DAMASCENO; BRITO, 2006). Vários estudos têm mostrado o empenho de pesquisadores em identificar e quantificar compostos presentes em sementes de moringa, bem como, investigar suas relações com importantes propriedades terapêuticas exibidas pela espécie.

A alta concentração de compostos fenólicos detectados em sementes de moringa tem contribuído para o registro do seu potencial antioxidante (JAHAN et al., 2018). Extratos aquosos das sementes avaliados por Gaafar et al. (2016) apresentaram, simultaneamente, alto poder anti-inflamatório, antioxidante e antimicrobiano. A eficiência na eliminação de radicais livres responsáveis pelos efeitos oxidantes ocorreu nos extratos com maior conteúdo fenólico dos quais sete compostos foram identificados como sendo ác. elágico, ác. tânico, quercetina,

cumarina, ác. benzóico, catequina e ác. cafeico, além de diversos açúcares incluindo, maltose, rafinose e lactose como os mais abundantes. Já o efeito de moringa contra lesões e fibrose hepática em ratos mostrou o potencial hepatoprotetor da planta atribuindo-o a mecanismos relacionados às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (HAMZA, 2010). Correlação entre o conteúdo antioxidante e a atividade antidiabética de moringa foi ainda sugerida por Al-Malki; El Rabey (2015) quando os autores mostraram os efeitos de baixas doses do pó das sementes na restauração de funções renais e histologia de rins e pâncreas de ratos diabéticos. Possuindo mais de quarenta antioxidantes naturais, a moringa pode fornecer proteção contra infecções e doenças degenerativas (MAHMOOD; MUGAL; HAQ, 2010).

Através de mensuração *in vitro*, a partir de macrófagos murinos, Araújo et al. (2013) e Jaja-Chimedza et al. (2017) mostraram a participação de lectinas e de isotiocianatos, respectivamente, isolados das sementes de moringa na redução dos níveis de mediadores envolvidos em processos inflamatórios. Ambos estudos através de testes *in vivo*, usando modelo de edema de pata induzida por carragenina, confirmaram as propriedades do extrato aquoso das sementes sobre os efeitos da inflamação aguda. Usando porquinhos da índia como modelo animal para realização de estudos contra asma, doença inflamatória crônica, Mahajan; Mehta (2011) mostraram que o β -sitoesterol, um fitoesterol isolado a partir de extratos alcóolicos das sementes de moringa, exerceu fortes efeitos sobre a inflamação de vias aéreas sendo eficaz contra produção de citocinas e capaz de bloquear a liberação de mediadores como a histamina.

Evidências dos efeitos antimicrobianos e antiparasitários de moringa também têm sido largamente reportadas e reunidas em estudos científicos de revisão (FATIMA et al., 2014; WANG; CHEN; WU, 2016). As sementes, em especial, têm demonstrado efeitos antibacterianos (BELLO; JAMIU, 2017; DELELEGN; SAHILE; HUSEN, 2018), antifúngicos (EL-MOHAMEDY; ABDALLA, 2014; NETO et al., 2017), antivirais (CHOLLOM et al., 2012; WAIYAPUT et al., 2012), inseticidas (OLIVEIRA et al., 2011; SANTOS et al., 2012) e anti-helmínticos (CABARDO; PORTUGALIZA, 2017; GIRI et al., 2010; SALLES et al., 2014). Alguns dos responsáveis por muitas dessas propriedades já foram identificados, sendo bastante recorrente o registro de moléculas com efeitos multifuncionais. Lectinas, por exemplo, são moléculas de amplo potencial farmacológico. Duas das principais lectinas isoladas das sementes de moringa, cMoL (coagulant *M. oleifera* Lectin) e WSMoL (Water Soluble *M. oleifera* Lectin), estão ambas envolvidas com diversas propriedades ativas da espécie, incluindo: efeitos anti-inflamatórios (ARAÚJO et al., 2013); ação inseticida com potencial para controle de pestes como *Anagasta kuehniella* (traça da farinha) e ação ovicida e larvicida contra *Aedes aegypti* (COELHO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011; SANTOS et al., 2012); ação

sobre diferentes espécies fúngicas como *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicales* e *C. glabrata* (OLIVEIRA, 2017); e efeitos sobre diversas espécies de bactérias de importância clínica como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus* (CORIOLANO et al., 2019; FERREIRA et al., 2011; MOURA et al., 2017; OLIVEIRA, 2017).

Outros importantes bioativos antimicrobianos isolados das sementes incluem: peptídeos catiônicos capazes de danificar células bacterianas por fusão de membranas (GHEBREMICHAEL et al., 2005; SHEBEK et al., 2015); glicosinolatos e isotiocianatos que possuem fortes efeitos contra fungos e/ou bactérias patogênicas (OLUDURO et al., 2010); e proteínas ligantes à quitina que se apresentam como diferentes isoformas e possuem atividade antifúngica com mecanismos de ação diversificados causando efeitos inibitórios sobre o crescimento de micélios ou por aumento de permeabilidade de membranas e produção de espécies reativas de oxigênio (BATISTA et al., 2014; NETO et al., 2017).

Quanto às propriedades antiparasitárias de moringa, diversas classes de parasitos têm sido alvos de bioativos presentes nas sementes. Extratos aquosos foram reportados como inseticidas naturais por seus efeitos *in vitro* contra diferentes estágios de vida de espécies de mosquitos como *Aedes aegypti* (COELHO et al., 2009) e *Culex quinquefasciatus* (ASHFAQ; ASHFAQ, 2012). Investigações de atividade antiplasmodial *in vivo* de extratos alcóolicos e hexânicos das sementes de moringa mostraram progressiva redução de parasitemia causada por *Plasmodium berghei*, protozoário usado como modelo para estudos voltados ao desenvolvimento de tratamentos antimaláricos (OLASEHINDE et al., 2012). A moringa também é frequentemente citada como planta medicinal utilizada para tratamento de infecções helmínticas (FATIMA et al., 2014; IDRIS; WINTOLA; AFOLAYAN, 2019). Diferentes partes da planta têm sido usadas e mostram efeitos sobre classes distintas de vermes, principalmente nematelmintos (ALMANZOR et al., 2014; GIRI et al., 2010; MOYO; MASIKA; MUCHENJE, 2014; SALLES et al., 2014).

Diante do vasto cenário de oportunidades de utilização biotecnológica a partir da espécie *M. oleifera*, as seções a seguir contemplarão mais especificamente os campos de aplicações encontrados neste estudo.

2.4 Moringa e o processo coagulante/floculante

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 633 milhões de pessoas no mundo ainda permanecem sem acesso a uma fonte de água potável (WHO UNICEF, 2015)

e pelo menos uma em cada quatro pessoas, o equivalente a 1,8 bilhões de pessoas, bebe água contaminada por coliformes fecais (WHO, 2017). Em muitas partes do mundo o acesso à água de qualidade está entre os principais problemas enfrentados e somado a isso projeções mostram que o uso da água tem aumentado globalmente em cerca de 1% ao ano e deverá continuar aumentando a uma taxa similar até 2050 (BORETTI; ROSA, 2019).

Águas brutas de fontes naturais apresentam material particulado em suspensão, o que as tornam impróprias para o consumo fazendo-se necessário a realização de tratamentos a fim de que parâmetros técnicos de potabilidade sejam atingidos. Os materiais suspensos vão desde micróbios e outros conteúdos biológicos, mas principalmente materiais inorgânicos tais como sílica, aluminossilicatos, ferro, óxidos de manganês dentre outros, que podem causar alterações de cor, turbidez, gosto, além de serem fontes de contaminação e doenças. Para que as impurezas sejam removidas das águas essas devem ser tratadas através de procedimentos físico-químicos que consistem numa série de etapas que envolvem processos distintos e sequenciais tais como coagulação, floculação, sedimentação, filtração, desinfecção e fluoretação (BOLTO; GREGORY, 2007). As duas primeiras etapas, coagulação e floculação, são comumente referidas como processo coagulante/floculante (CF), uma vez que ocorrem de forma consecutiva e dependente, e cuja eficiência influencia diretamente no resultado final do tratamento, sendo importantes principalmente para remoção dos coloides em suspensão que produzem alta turbidez na água (ABIOLA, 2018; TZOUPANOS; ZOUBOULIS, 2008).

O termo coagulação refere-se a uma etapa onde inicialmente é promovida uma desestabilização elétrica de partículas coloidais, que em suspensão apresentam carga de superfície negativa. Essa etapa ocorre mediante adição de um agente coagulante em associação a uma rápida agitação da água que varia de alguns segundos a poucos minutos (**Figura 3**). No sistema de tratamento convencional os coagulantes são em sua maioria constituídos por polímeros inorgânicos sintéticos, geralmente a base de sais de alumínio ou ferro, sendo o sulfato de alumínio ($Al_2(SO_4)_3$) o mais utilizado. Quando adicionados à água, esses íons altamente carregados neutralizam as partículas em suspensão (BRANDT et al., 2017; ZAND; HOVEIDI, 2015).

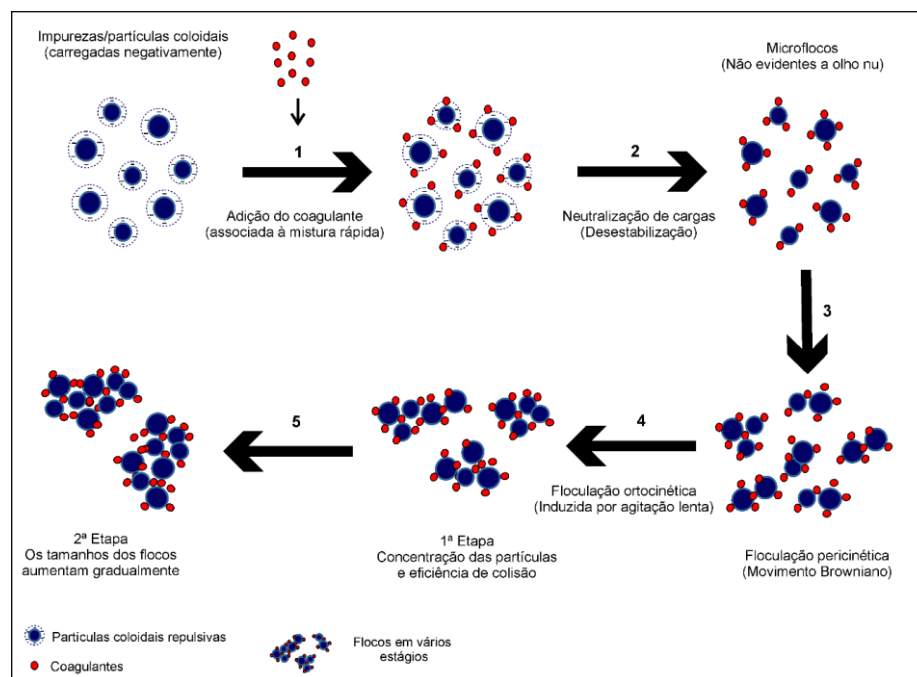
Imediatamente após a coagulação ocorre a floculação, referente a uma etapa de agitação lenta (20 a 45 min) através da qual será induzido o contato entre as partículas já desestabilizadas de maneira a possibilitar a formação de agregados que ao interagirem formarão flocos cada vez maiores e mais densos (**Figura 3**) que poderão ser facilmente removidos na etapa de sedimentação (TZOUPANOS; ZOUBOULIS, 2008). Assim, no processo CF as partículas

dispersas naturalmente estáveis são transformadas em aglomerados instáveis e insolúveis (ABIOLA, 2018).

A desestabilização das partículas em suspensão e a ocorrência do processo CF irá depender do tipo de coagulante utilizado e pode ser explicada e alcançada via quatro mecanismos: (a) compressão da camada elétrica dupla, (b) adsorção e neutralização de cargas, (c) adsorção e ponte interpartículas e (d) coagulação de varredura (CRITTENDEN et al., 2012).

No geral, a utilização de coagulantes químicos oferece uma forma de tratamento da água consideravelmente fácil, eficiente e de custo moderado, uma vez que são amplamente disponíveis. No entanto, esses produtos podem introduzir à água características indesejáveis e/ou prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente. Dentre os principais problemas envolvendo o uso dos coagulantes sintéticos convencionais, como o sulfato de alumínio, estão: alterações de condutividade da água e diminuição do pH, o que implica na adição de substâncias alcalinas para correção final de pH (BRANDT et al., 2017; NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995); geração de consideráveis volumes de lodo não biodegradável e capacidade de geração de produtos tóxicos a partir de intermediários de degradação; e ainda, o teor residual químico presente na água após o tratamento, que no caso do alumínio tem sido associado com desordens neurológicas e doença de Alzheimer (SULAIMAN et al., 2017; WALTON, 2014).

Figura 3 – Processo de coagulação/floculação via neutralização de cargas



Fonte: Adaptada pela autora a partir de CHOY et al. (2015).

Frente aos desafios e inadequações do uso de polímeros sintéticos no tratamento de águas, alternativas não convencionais como a utilização de coagulantes de origem natural, que já são exploradas a muito tempo, tornam-se cada vez mais atraentes diante das novas necessidades surgidas ao longo dos anos (CHOY et al., 2015; MUTHURAMAN; SASIKALA, 2014). Os esforços da comunidade científica na busca por coagulantes naturais revelam uma tendência de estudos voltados majoritariamente para agentes coagulantes/floculantes de origem vegetal, onde são destacadas as vantagens desses compostos incluindo a abundância de disponibilidade, menor custo econômico, biodegradabilidade, não-toxicidade, não corrosividade, preservação de pH, menor geração de lodo, além de comportamentos multifuncionais (ABIOLA, 2018; AMRAN et al., 2018; NDABIGENGESERE; SUBBA NARASIAH, 1998; VALVERDE et al., 2018).

Moringa oleifera está dentre os materiais vegetais mais estudados e eficientes para o processo CF, onde suas sementes sem dúvidas apresentam grande destaque e são reconhecidas mundialmente pelo alto desempenho em promover reduções significativas dos níveis de turbidez em diferentes tipos de água (NORDMARK; PRZYBYCIEN; TILTON, 2016; SULAIMAN et al., 2017).

Moléculas proteicas de diferentes massas moleculares têm sido particularmente reportadas como os principais agentes ativos identificados em sementes de moringa. Geralmente são dotadas de propriedades multivalentes e muitos estudos demonstram estarem envolvidas simultaneamente com efeitos floculantes e antimicrobianos da espécie, tornando-as eficientes não apenas na clarificação de águas como também atuando no processo de desinfecção das mesmas (BINA et al., 2010; MOURA et al., 2016; SHEBEK et al., 2015).

Investigações preliminares da década de 90 já apontavam que moléculas proteicas catiônicas variando entre 6 e 16 kDa eram os principais componentes ativos de *M. oleifera* envolvidos com as propriedades coagulantes/floculantes (GASSENSCHMIDT et al., 1995; NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995). Pequenas proteínas, denominadas MO 2.1 e MO 2.2, com massa molecular em torno de 6,5 kDa ou sob a forma de dímeros de 13 kDa foram os primeiros agentes floculantes caracterizados em sementes de moringa. Além da baixa massa molecular, as moléculas contendo cerca de 60 resíduos de aminoácidos (aa) e rico conteúdo de glutamina, arginina e prolina, apresentavam alta densidade de cargas positivas com pontos isoelétricos (pI) entre 10 e 11 (GASSENSCHMIDT et al., 1995; NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995). Posteriormente, diversos estudos com MO 2.1 e MO 2.2 revelaram os efeitos dessas moléculas também contra microrganismos, e as características de

massa molecular e cargas foram apontadas como essenciais tanto para ação floculante quanto antimicrobiana (BROIN et al., 2002; GHEBREMICHAEL et al., 2005; SHEBEK et al., 2015).

Contudo, sabe-se que as propriedades coagulante/floculante de moringa são resultantes do efeito conjunto entre diferentes agentes, e proteínas de alta massa incluindo lectinas também têm demonstrado papéis importantes como biocoagulantes. cMoL, uma lectina de moringa com massa em torno de 30 kDa, termoresistente e também de caráter básico demonstrou alta eficiência de redução de turbidez, porém sua atividade foi afetada quando na presença de alguns íons como Ca^{+2} , Mg^{+2} ou Mn^{+2} (LUZ et al., 2013; SANTOS et al., 2009). WSMoL, uma lectina solúvel em água com massa molecular de 60 kDa, estruturalmente constituída por arranjos oligoméricos de subunidades de 5 kDa, teve sua atividade floculante comprovada associada à redução da resistência elétrica medida em solução de argila e foi capaz de promover efeitos coagulantes, bactericidas e/ou bacteriostático sobre algumas espécies de bactérias através de alterações na permeabilidade das membranas e perda de integridade celular. Curiosamente, WSMoL foi descrita como uma proteína aniônica (pI 5,5) diferentemente dos outros agentes floculantes de moringa (CORIOLANO et al., 2019; MOURA et al., 2016). Contudo, tanto cMoL quanto WSMoL apresentaram similaridades de sequência com os peptídeos floculantes MO2.1 e MO2.2 (COELHO et al., 2009; LUZ et al., 2013). Tem-se ainda registros que dentre os compostos ativos há a presença de uma proteína de 66 kDa com moderada atividade floculante, mas sem efeitos antimicrobianos detectados (AGRAWAL; SHEE; SHARMA, 2007). O único registro de compostos floculantes não proteicos encontrados em moringa foi o de Okuda et al. (2001) que identificou um polieletrólito orgânico cuja natureza não era proteica, lipídica ou glicídica.

Os mecanismos de ação dos agentes ativos de moringa quanto à cinética de desinfecção ainda não são totalmente esclarecidos, porém, quanto aos efeitos de coagulação/floculação acredita-se que o principal mecanismo envolvido seja o de adsorção e neutralização de cargas (BICHI, 2013; NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995).

O fato da moringa apresentar agentes floculantes e propriedades antimicrobianas, conjuntamente ou não, é apontado como uma grande vantagem para seu uso no tratamento de água, uma vez que há perigo iminente dos suprimentos de água serem expostos a contaminação por organismos patogênicos (DELELEGN; SAHILE; HUSEN, 2018). Pois embora o cloro seja um produto de desinfecção universalmente utilizado, o mesmo apresenta problemas em casos de subcloração ou supercloração. Devido à evaporação sua concentração é reduzida à medida que a água flui através da rede de distribuição, e ademais tem potencial para formar subprodutos

de desinfecção que podem ser carcinogênicos e mutagênicos, havendo um reconhecimento da necessidade de alternativas de desinfecção (CHEUNG, 2017).

O uso de moringa como biofloculante é largamente incentivado, e inúmeros são os registros que mostram suas características sobrepondo-se à utilização de químicos convencionais, que vão desde eficiência similar aos coagulantes sintéticos passando pelo fato de não interferirem no pH e condutividade da água tratada até a sua segurança à saúde quando utilizada de forma correta (NDABIGENGESERE; SUBBA NARASIAH, 1998; ROLIM et al., 2011; TUNGGOLOU; PAYUS, 2017).

Muito embora existam centenas de estudos sobre o potencial dos coagulantes naturais, sabe-se que algumas lacunas devem ser consideradas, principalmente aquelas entre o processo de descoberta nos laboratórios e aplicações reais de mercado. Nesse sentido, pesquisadores têm pontuado questões pertinentes tais como necessidade do isolamento de compostos coagulantes a fim de evitar a sobrecarga de matéria orgânica na água tratada. Outro ponto é a abordagem científica para a identificação adequada dos componentes ativos, uma vez que erros nesse processo geralmente levam a conflitos quanto aos mecanismos de coagulação propostos para coagulantes derivados da mesma fonte e constituem apenas especulações. Há ainda informações sobre as características gerais de qualidade da água tratada, que são pertinentes às questões de segurança e raramente fornecidas em estudos de bancada; e tão importante quanto, é a necessidade de estratégias para a disseminação dos resultados das pesquisas às agências governamentais e não governamentais apropriadas, possibilitando a ligação entre os usuários finais e pesquisadores (ABIOLA, 2018).

2.5 Moringa e o cenário de verminoses em pequenos ruminantes

2.5.1 Helmintoses gastrintestinais

A ovinocaprinocultura é uma prática global e está relacionada tanto a questões culturais como socioeconômicas (DOSSA et al., 2015; GUILHERME et al., 2017). No mundo, são mais de 2,2 bilhões de caprinos e ovinos, e no Brasil há um efetivo de quase 30 milhões de cabeças, sendo 18,9 milhões de ovinos e 10,7 milhões de caprinos, aproximadamente (FAO, 2018). O rebanho nacional concentra-se especialmente nas regiões Sul e Nordeste, com destaque para última, que dispendo de condições favoráveis à criação desses animais, detém mais de 90% do rebanho caprino e quase 60% do rebanho ovino brasileiro (ZEN; SANTOS; MONTEIRO, 2014).

O acometimento de pequenos ruminantes por alguns tipos de enfermidades, principalmente infecciosas, é recorrente e tem acarretado impactos negativos que comprometem severamente a saúde, o bem-estar dos animais e a eficiência do sistema produtivo (LIRA et al., 2013; ZAINALABIDIN et al., 2015). E, uma vez que a produtividade dos animais está intimamente relacionada à saúde, diferentes formas de manejos devem constituir o gerenciamento da cadeia produtiva a fim de priorizar a promoção da saúde, a prevenção às doenças, a biossegurança e a qualidade dos alimentos produzidos a partir dela (RODRIGUES et al., 2012).

Estudos epidemiológicos realizados em diversas partes do mundo ao longo dos anos nos dão uma dimensão das principais doenças em pequenos ruminantes, e mostram ainda a prevalência de espécies parasitas, relação parasito-hospedeiro, fatores de risco para determinada enfermidade, características ambientais e principais estratégias de controle adotadas para mitigação dos efeitos (COSTA; SIMÕES; RIET-CORREA, 2009; LAMBERTZ et al., 2018; VIEIRA et al., 2014).

De acordo com os levantamentos, infecções helmínticas lideram a lista de doenças mais detectadas nos rebanhos em nível global, sendo as helmintoses gastrintestinais (GI) endêmicas entre pequenos ruminantes (GUILHERME et al., 2017; MUSHONGA et al., 2018). Em quase 100 % dos rebanhos pelo menos um animal apresenta-se positivo para helmintoses, abrigando uma ou mais espécies de parasitos, porém a presença de verme não significa necessariamente o estabelecimento da doença (VIEIRA et al., 2014; WILMSEN et al., 2014; ZAINALABIDIN et al., 2015).

As helmintoses GI, amplamente disseminadas, são transmitidas de forma horizontal e direta e acometem os animais indiscriminadamente, no entanto, existem relações importantes que determinam o tipo e a severidade das infecções (ROEBER; JEX; GASSER, 2013). O estabelecimento da infecção leva em consideração fatores intrínsecos ao hospedeiro, como por exemplo: idade, sexo, imunidade, condição corporal, genética; onde verificam-se categorias mais susceptíveis que é o caso de animais jovens e fêmeas no período periparto, havendo uma relação com períodos de baixa imunidade (EMIRU et al., 2013; ISLAM et al., 2017; MUSHONGA et al., 2018). Fatores ambientais também têm influência, como clima, estações do ano, pluviosidade, tipo de vegetação e microclima. E existe ainda as características de cada parasito. As interações entre hospedeiro e parasito incidem sobre as chances de a doença ocorrer e sobre o padrão de infecção, já as relações ambiente-hospedeiro e ambiente-parasito irão influenciar na transmissão da doença (ROEBER; JEX; GASSER, 2013). Dessa forma, o

conhecimento de dados epidemiológicos de uma região é de suma importância no sentido de elaborar e orientar sobre diferentes práticas de controle e profilaxia.

No geral, as helmintoses GI são crônicas e com sintomas subclínicos, porém sob certas circunstâncias os animais infectados podem apresentar altas taxas de morbidade, apresentando perda de peso, crescimento reduzido, diminuição produtiva (ex. leite), reprodutiva e nas últimas consequências podem chegar a óbito. Além disso, existem as perdas econômicas associadas ao aumento da demanda alimentar e custos adicionais com tratamentos veterinários (CHARLIER et al., 2017; LAMBERTZ et al., 2018). De maneira implícita, os impactos das helmintoses sobre a eficiência produtiva podem ser divididos de acordo com três aspectos principais: (i) redução na ingestão de alimentos, característica comum a todas as infecções por helmintos e que está ligada a alterações hormonais no hospedeiro; (ii) danos diretos aos tecidos e diminuição do funcionamento dos órgãos afetados; e (iii) desvio de recursos energéticos e proteicos do hospedeiro que a princípio subsidiariam à produção, mas que terão de ser destinados para os mecanismos imunológicos de defesa (CHARLIER et al., 2017).

Como a saúde dos animais está fortemente atrelada às condições sanitárias, o que se tem observado é que em muitas propriedades o registro de manejo sanitário é ausente, inadequado e/ou precário (GUILHERME et al., 2017). Sabe-se que ações empregadas pelos produtores podem resultar na diminuição do surgimento de doenças nos rebanhos, mitigando assim os impactos econômicos causados por elas, pois essas irão controlar influências negativas do meio ambiente, de modo a prevenir o estabelecimento de enfermidades ou controlar as já existentes. No caso das helmintoses GI, devido a eficiência e conveniência de uso, a utilização de anti-helmínticos sintéticos é a principal, e às vezes única, estratégia de controle utilizada, com registros dessa prática em mais de 50% das propriedades, onde em muitos casos é realizada de forma periódica e sem diagnóstico prévio, constituindo um sério fator de risco (GUILHERME et al., 2017; LAMBERTZ et al., 2018; VIEIRA et al., 2014). No entanto, essa é uma prática considerada insustentável, que além de elevar em demasia o custo de produção, resulta em parasitos resistentes às drogas disponíveis e causam impactos diretos na saúde dos consumidores e no meio ambiente (BEYENE, 2015; SALGADO; SANTOS, 2016; VERCRUYSSSE et al., 2018; VIEIRA et al., 2014).

Os maiores danos causados pelas helmintoses GI estão relacionados a fatores como intensidade de infecção, prevalência e grau de patogenicidade de determinadas espécies. Vermes pertencentes aos gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Oesophagostomum* e *Strongyloides* são os mais frequentes nos rebanhos brasileiros, sendo a espécie *Haemonchus contortus* distribuída mundialmente e destacando-se entre as mais prevalentes (ISLAM et al.,

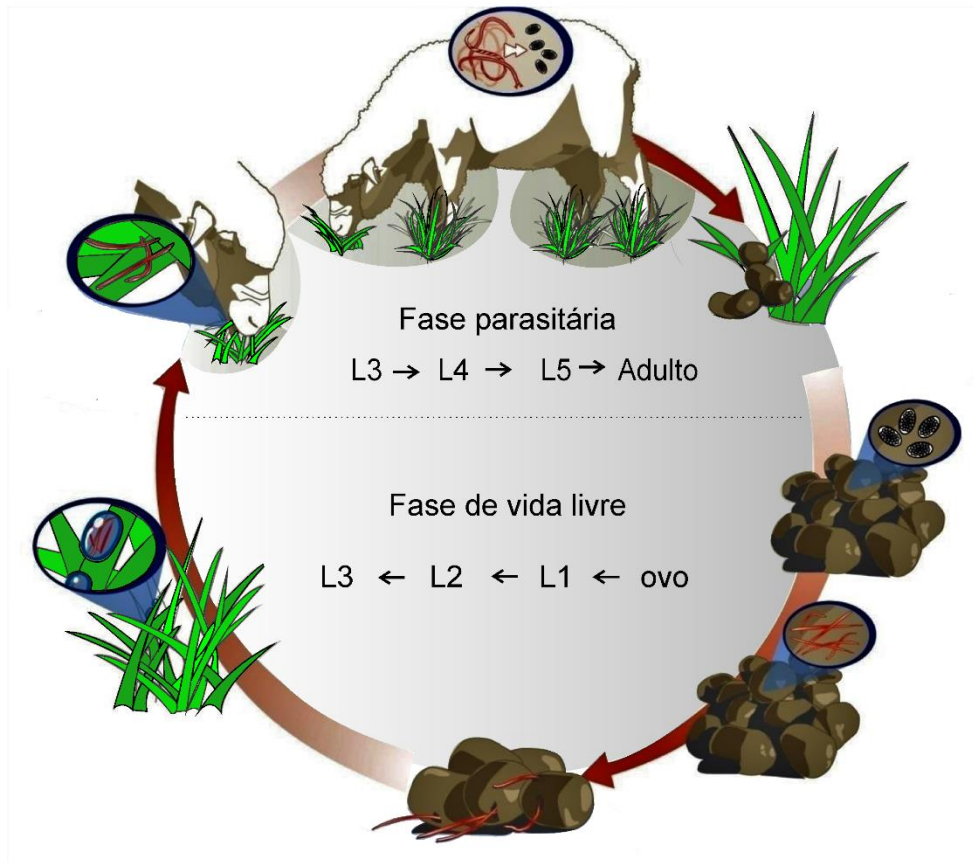
2017; LAMBERTZ et al., 2018; ROEBER; JEX; GASSER, 2013; VIEIRA et al., 2014; WILMSEN et al., 2014).

2.5.2 *Haemonchus contortus*

Embora o acometimento de pequenos ruminantes por verminoses GI seja geralmente do tipo poliparasitário, *Haemonchus contortus* é uma espécie onipresente que se destaca como a mais prevalente e patogênica, sendo sua importância econômica reconhecida globalmente (AMARANTE, 2014; WANG et al., 2017).

Pertencente à Superfamília Trichostrongyloidea, *H. contortus* possui um ciclo biológico semelhante ao de outros trichostrongilídeos, porém com suas particularidades. O ciclo é direto e dividido em fase pré-parasitária, com estágios de vida livre no ambiente; e fase parasitária dentro do hospedeiro (**Figura 4**). A fase de vida livre começa quando o hospedeiro infectado elimina no ambiente fezes contendo os ovos do parasito. Nas primeiras 24 horas larvas de primeiro estágio (L1) eclodem dos ovos e são liberadas no conteúdo fecal, onde irão se alimentar de matéria orgânica e microrganismos presentes nas próprias fezes. As L1 então realizam uma mudança de cutícula e dão origem às larvas de segundo estágio (L2), que continuam se alimentando e se desenvolvendo até dar origem a uma larva infectante de terceiro estágio (L3). A fase de desenvolvimento de ovo a L3 acontece em até 7 dias a partir da postura. Larva L3 retêm a cutícula do segundo estágio e, portanto, apresentam uma cutícula dupla (bainha) o que não permite mais que se alimentem no ambiente, passando a sobreviverem com as reservas que acumularam durante os estágios anteriores. Em ambiente favorável (temperatura e umidade) as L3 podem sobreviver por meses e devido apresentarem movimentação ativa podem migrar para pastagem sendo influenciadas fortemente pelas condições climáticas. Os hospedeiros (caprinos e ovinos) ao se alimentarem ingerem as L3 junto com a pastagem dando início ao período parasitário. No rúmen do animal, a bainha protetora que reveste L3 é perdida e as larvas seguem para o abomaso. *Haemonchus ssp.* apresentam uma fase histotrófica, que é quando as L3 penetram nas glândulas gástricas do abomaso, onde irá ocorrer a muda de L3 para L4. As L4 então retornam à luz intestinal, fazem a última muda para L5 que amadurecem sexualmente até tornarem-se adultas. Os adultos migram livremente na superfície da mucosa e após copularem as fêmeas iniciam a oviposição com cada fêmea produzindo de 500 a 10.000 ovos por dia, que são liberados no ambiente reiniciando o ciclo. O período pré-patente é de 2 a 3 semanas (AMARANTE, 2014; MOLENTO; BRAZ, 2017).

Figura 4 – Ciclo biológico do endoparasito *Haemonchus contortus*.



Fonte: Adaptado pela autora a partir de <http://www.wormboss.com.au/sheep-goats/programs/sheep/tas/appendices/roundworm-life-cycle-and-larval-availability.php>

A enfermidade decorrente da infecção por *H. contortus* é denominada de Hemoncose, cuja gravidade deve-se aos hábitos essencialmente hematofágicos desse verme. Durante toda sua vida parasitária, *H. contortus* alimenta-se de sangue e cada verme consome de 0,05 a 0,08 mL de sangue/dia. Essa verminose diminui em demasia o potencial produtivo dos animais, em especial pela dificuldade de controle da população de parasitos. Os quadros de Hemoncose podem ser caracterizados em: hiperagudo, que geralmente ocorre quando animais suscetíveis são expostos à alta carga parasitária (L3) provocando anemia severa, fezes escuras e morte súbita, pode haver também gastrite hemorrágica intensa; quadro agudo, onde a anemia pode ocorrer rapidamente, mas existe uma resposta eritropoiética da medula óssea e a anemia é acompanhada de hipoproteïnemia, edema submandibular, ascite, letargia, fezes escuras (normalmente não há diarreia), queda de pelo/lã, e conseqüentemente óbito; e quadro crônico, que é o mais comum e de relevância econômica. Manifesta-se por infecção crônica com carga baixa de parasitos, mas índices de morbidade podem ser de 100% com mortalidade variável de 0,5 a 20%. A anemia e a hipoproteïnemia podem ser graves, a depender da capacidade

eritropoiética e das reservas nutricionais do animal. Ocorre perda de peso, fraqueza, no entanto, a anemia é o sinal clínico mais evidente (MOLENTO; BRAZ, 2017)

2.5.3 Estratégias de controle e perspectivas futuras

O uso generalizado e repetido de vermífugos químicos para o tratamento de verminoses GI tem como principal entrave o rápido desenvolvimento e disseminação do fenômeno da resistência, problema que torna urgente e necessária a busca por novas estratégias de intervenção (ALBUQUERQUE et al., 2017; KOTZE; PRICHARD, 2016; SALGADO; SANTOS, 2016).

Diante do aumento dos relatos de resistência, pesquisadores ao redor do mundo têm criado programas e diretrizes voltados para promoção do controle sustentável de verminose, como exemplo temos o SCOPS (*Sustainable Control Of Parasites in Sheep*) no Reino Unido, o “WormKill” e o “WormBoss” na Austrália (TAYLOR, 2012; WOODGATE; LOVE, 2012). No Brasil também se defende a importância da adoção do Sistema Integrado de Controle Parasitário (SICOPA) que consiste em um conjunto de estratégias que quando utilizadas de maneira complementar contribuem para reduzir o risco das infecções clínicas (MOLENTO; BRAZ, 2017). Sabe-se que prejuízos causados por nematódeos GI podem ser minimizados associando-se métodos de controle integrado que vão incidir sobre a contaminação dos animais e da pastagem, visando principalmente a redução do número de tratamentos químicos, o que consequentemente auxilia na manutenção da eficácia das drogas antiparasitárias disponíveis (VELDE; CHARLIER; CLAEREBOU, 2018).

De modo geral as recomendações baseiam-se na utilização coordenada de diferentes abordagens químicas e não químicas que incluem o uso combinado de diferentes classes de drogas nematicidas, vermifugações direcionadas e seletivas para manutenção de populações de refúgia (vermes que não são selecionados pelo tratamento medicamentoso), seleção de animais geneticamente resistentes, fortalecimento do estado nutricional, fitoterapia, métodos biológicos com uso de fungos nematófagos e realização de manejo de pastagem (MINHO, 2014; MOLENTO et al., 2013; VELDE; CHARLIER; CLAEREBOU, 2018).

Especulações para futuro, que também levam em consideração as mudanças nos padrões de infecção frente às alterações climáticas, práticas agrícolas e uso das terras, já reforçam o papel dos avanços científicos para o desenvolvimento de métodos de controle mais eficientes, robustos e sustentáveis (VERCRUYSSSE et al., 2018). A previsão é que a busca por novos anti-helmínticos continue evoluindo apesar do tempo e dos custos em colocar uma nova droga ao

mercado. No entanto, o uso deverá ser cada vez mais seletivo e deve expandir-se para incluir a utilização de extratos vegetais como ferramentas relevantes (GEARY; SAKANARI; CAFFREY, 2015; VERCRUYSSSE et al., 2018). O foco em produtos naturais também vislumbra a exploração de propriedades anti-helmínticas diretamente a partir do consumo das chamadas forragens bioativas, associando assim benefícios antiparasitários e nutricionais devido à presença de compostos ativos em plantas usadas na alimentação dos animais (VERCRUYSSSE et al., 2018) como tem sido demonstrado em estudos com plantas ricas em determinados tipos de metabólitos (KLONGSIRIWET et al., 2015). A menor dependência dos quimioterápicos também contará com o desenvolvimento de vacinas e novas ferramentas de diagnóstico (MATOS et al., 2017; VERCRUYSSSE et al., 2018).

Considerando a importância da verminose GI na produção de pequenos ruminantes, num futuro próximo é esperado que a tomada de decisões acerca das estratégias de controle a serem utilizadas possam dar um enfoque geral a todos os elementos envolvidos no processo produtivo desde o bem estar animal, passando por aspectos ambientais diretos e indiretos até as vantagens econômicas (NIAMIR-FULLER, 2016). Nesse sentido, devem ser incentivados os investimentos em pesquisas para prospecção de formas de controles alternativas de baixo custo e menos nocivas. Dentre as estratégias não químicas, a fitoterapia e manejo de pasto são métodos considerados promissores, cuja comprovação da eficácia vem sendo alvo de diversos estudos.

2.5.4 Atividade anti-helmíntica e potencial fitoterápico de moringa

Informações etnofarmacológicas acerca das propriedades anti-helmínticas da moringa têm fundamentado a realização de estudos científicos visando à confirmação e compreensão desses efeitos (AGYARE et al., 2014; SIVASANKARI; ANANDHARA; GUNASEKARAN, 2014). As investigações mostram que a moringa é capaz de atuar sobre vermes de diferentes classes e em diferentes estágios de vida dos parasitos (**Tabela 1**).

Salles et al. (2014) avaliaram a atividade anti-helmíntica de várias espécies sobre ovos de nematoides GI (prevalência > 90% para *H. contortus*). Nesse estudo, o extrato aquoso das sementes de moringa destacou-se entre os mais eficientes para atividade ovicida, sendo relatada uma taxa de inibição da eclosão superior a 90% quando utilizada uma concentração equivalente a 0,2 mg de proteínas/mL. O estudo revelou ainda que os principais agentes ativos eram moléculas de baixa massa molecular (< 12 kDa) e sugeriu que compostos de naturezas distintas

estavam envolvidos com os efeitos observados, dos quais proteínas floculantes foram apontadas como agentes anti-helmínticos em potencial.

Dentre as poucas evidências do envolvimento de proteínas presentes nas sementes de moringa com as propriedades nematicidas da espécie tem-se um estudo realizado com WSMoL, uma lectina oligomérica ácida e inibida por frutose (MEDEIROS et al., 2018). A lectina purificada demonstrou efeitos moderados sobre ovos ($250 \mu\text{g/mL} = 40,4\%$ de ovos não eclodidos) e larvas ($125 \mu\text{g/mL} = 63,8\%$ das larvas não se desenvolveram) de nematoides GI. Utilizando testes *in vitro*, os autores observaram que a atividade ovicida e larvicida de WSMoL foi parcialmente reduzida quando na presença de frutose, indicando que as lectinas podem atuar através de diferentes mecanismos de ação e um deles envolve a participação dos sítios de ligação a carboidratos. Análises na presença de WSMoL ligada à fluoróforo revelaram a afinidade da lectina tanto às estruturas constituintes do material embrionário dentro dos ovos quanto às estruturas ao longo do corpo das larvas.

Ainda de natureza proteica, exsudatos proteicos das sementes de moringa apresentaram atividade anti-helmíntica contra ovos e larvas (J2) de *Meloidogyne incognita*, um nematoide endoparasito de raízes de plantas. Invaginações, ranhuras de superfície, rachaduras e perda de conteúdo interno estavam entre os efeitos deletérios observados sobre os ovos, enquanto nas larvas os efeitos foram tanto nematicidas quanto nematostáticos com 100% de mortalidade ou 100% de redução de motilidade. Análises do material ativo revelaram a presença de várias classes de proteínas relacionadas à patogênese (RP) como β -glucanases, quitinases, proteases serínicas e cisteínicas, além de inibidores de proteases (SOUSA et al., 2019).

Tabela 1 - Estudos relacionados a propriedades anti-helmínticas de *Moringa oleifera*.

| Classe | Espécie | Estágio parasitário | Parte da planta | Compostos envolvidos | Teste | Autores |
|-----------|------------------------------|------------------------|-------------------|---|-------------------------|--------------------------------|
| Nematoda | <i>Meloidogyne incognita</i> | ovos; larvas (J2) | sementes | Proteínas-RP | <i>in vitro</i> | (SOUSA et al., 2019) |
| Nematoda | Nematoides GI ^a | ovos; larvas (L1-L3) | sementes | Lectina WSMoL | <i>in vitro</i> | (MEDEIROS et al., 2018) |
| Trematoda | <i>Fasciola hepatica</i> | ovos; adultos | sementes | NI ^b | <i>in vitro/in vivo</i> | (KANDIL et al., 2018) |
| Nematoda | <i>Haemonchus contortus</i> | larvas (L1 e L2) | folhas | NI ^b | <i>in vitro</i> | (MOHAMMED, 2018) |
| Nematoda | <i>Haemonchus contortus</i> | ovos; larvas (L3) | sementes | Taninos e saponinas | <i>in vitro</i> | (CABARDO; PORTUGALIZA, 2017) |
| Nematoda | <i>Haemonchus contortus</i> | ovos; larvas (L1 e L2) | folhas | MS ^c e carboidratos | <i>in vitro</i> | (TAYO et al., 2014) |
| Nematoda | Nematoides GI ^a | ovos | sementes | MS ^c e proteínas | <i>in vitro</i> | (SALLES et al., 2014a) |
| Trematoda | <i>Schistosoma japonicum</i> | adultos | folhas e sementes | NI ^b | <i>in vivo</i> | (ALMANZOR et al., 2014) |
| Nematoda | Nematoides GI ^a | adultos | folhas | Compostos fenólicos, taninos, proteínas, CuO ^d | <i>in vivo</i> | (MOYO; MASIKA; MUCHENJE, 2013) |

^a População mista de parasitos.

^b Não identificado.

^c Metabólitos secundários de diversas classes.

^d Óxido de cobre.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em estudo realizado por Cabardo e Portugaliza (2017) acerca da atividade anti-helmíntica de sementes de moringa sobre *H. contortus*, extratos etanólico e aquoso apresentaram eficiências ovicidas e larvicidas distintas. Ambos os extratos foram altamente eficazes em inibir a taxa de eclosão de ovos (95,89 e 81,72% de inibição, respectivamente). Os autores observaram que pelo menos 70% dos ovos tornaram-se inviáveis após contato com os extratos, seja por falharem na formação das larvas ou por permanecerem morulados. Ao avaliarem os mesmos extratos sobre larvas infectantes (L3), o extrato aquoso, no qual foi detectada a presença de saponinas, promoveu a maior taxa de mortalidade larval (92,5%) comparado ao extrato etanólico, no qual taninos foram detectados, e eficiência de 56,94% foi observada.

Mohammed (2018) avaliando o extrato etanólico das folhas de moringa em diferentes concentrações observou leve atividade nematicida sobre larvas L1 e L2 de *H. contortus* quando utilizada uma concentração de 30 mg/mL que resultou numa taxa de 33,3% de mortalidade. Em estudo relacionado, Tayo et al. (2014) mostraram resultados bem mais animadores, onde o extrato etanólico das folhas foi eficaz em inibir 99% a taxa de eclosão e promover 100% de mortalidade de L1 e L2 de *H. contortus*, sendo observado também resultados semelhantes para extratos aquosos avaliados sobre os mesmos estágios parasitários (97,9 e 89,6% de atividade ovicida e larvicida, respectivamente).

Folhas secas de moringa também foram utilizadas na suplementação da dieta de caprinos com o objetivo de avaliar seus efeitos sobre a carga de nematoides GI (MOYO; MASIKA; MUCHENJE, 2013). Os resultados mostraram que houve uma redução significativa da contagem de ovos nas fezes dos animais que receberam dietas à base de moringa, indicando o potencial anti-helmíntico da planta. Os autores especularam que o aporte proteico das folhas, o considerável teor de compostos fenólicos e a presença de taninos podem ter contribuído com os efeitos observados.

Os efeitos anti-helmínticos de moringa não se restringem aos helmintos da classe nematoda e também foram relatadas atividades deletérias sobre espécies pertencentes à classe trematoda. Kandil et al. (2018) mostraram os efeitos *in vitro* e *in vivo* do extrato metanólico das sementes de moringa sobre *Fasciola hepatica*. No estudo, efeitos ovicidas *in vitro* foram evidenciados por inibição da viabilidade dos ovos, assim como por inibição da eclodibilidade de miracídios formados. Já os testes *in vivo*, realizados em coelhos, mostraram reduções graduais da contagem de ovos dos parasitos nas fezes. Outra espécie helmíntica da referida classe e também afetada por moringa foi *Schistosoma japonicum*, cuja recuperação de vermes adultos, a partir de ratos experimentalmente infectados, foi menor para aqueles submetidos a

tratamentos com diferentes extratos de folhas e sementes de moringa quando comparada à quantidade de vermes recuperados de animais do grupo não tratado (ALMANZOR et al., 2014).

Embora muitos estudos atestando o potencial nematicida de moringa venham sendo realizados, nota-se que são escassas comprovações de seus efeitos através de ensaios *in vivo*. Ademais, considerando todas as propriedades de moringa, torna-se importante a realização de investigações a fim de explorar diferentes formas de utilização dessa planta visando seu emprego como alternativa ecológica para o controle de helmintos GI.

2.5.5 Manejo de pastagem no controle das helmintos GI

A alimentação é um aspecto crucial para um desempenho satisfatório dos animais e a depender da fonte pode resultar em economicidade e sucesso do negócio. A utilização de pastagens cultivadas é uma alternativa prática e barata para a produção de alimentos na criação de pequenos ruminantes oferecendo boa quantidade de fibras e de proteínas (EMERENCIANO NETO et al., 2017). No entanto, há que se considerar que o mesmo pasto fonte de nutrientes é também a principal fonte de contaminação do rebanho por helmintos GI, afinal 95% da população parasitária encontra-se no ambiente sob a forma de estágios de vida livre, fato que favorece quadros de reinfecções constantes.

O impacto do parasitismo na utilização de pastagens é influenciado tanto pelo metabolismo dos animais quanto por decisões de manejo tomadas pelos produtores (WALLER, 2006). E ainda, o grau de infecção adquirida durante o pastejo é afetado por diversos fatores inter-relacionados onde destacam-se as condições sazonais, tipo de pasto, comportamento ao pastear, imunidade e estado fisiológico dos animais (SEÓ et al., 2015).

Há tempos, o manejo de pastagens é defendido como uma abordagem chave para interromper o ciclo de vida dos nematoides e reduzir a exposição à infecção por minimizar o contato do hospedeiro com as larvas infectantes L3 no ambiente (TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008). As estratégias de manejo de pasto a fim de controlar infecções por nematoides parasitos em ruminantes podem ser classificadas em três categorias: (i) Preventivas - são aquelas onde animais livres de vermes são colocados em um pasto limpo ou há supressão da produção de ovos por tratamento anti-helmíntico no início da temporada de pastejo; (ii) Evasivas - dependem do movimento do rebanho para outro pasto antes que larvas infectantes estejam presentes em números significativos na pastagem original; e (iii) Dilutivas - exploram o pastejo simultâneo de animais suscetíveis com aqueles contendo resistência natural adquirida, sendo estes da

mesma espécie ou ainda o pastejo por rebanhos de diferentes espécies (revisado por WALLER, 2006).

Considerando a biologia, ecologia e dinâmica populacional dos parasitos, as principais estratégias propostas baseiam-se no descanso da pastagem, copastejo ou pastejo alternado, sistema integrado lavoura-pecuária e rotação de culturas (MAQBOOL et al., 2017). Embora essas práticas sejam consideradas eficientes em reduzir os níveis de infecções nos rebanhos, alguns desafios ainda precisam ser superados tais como os esforços exigidos para implementação das técnicas, disponibilidade de tempo e de pastagens, além da dependência de informações que envolvem conhecimentos epidemiológicos, que nem sempre estão disponíveis ao produtor (MOLENTO; BUZATTI; SPRENGER, 2016; VELDE; CHARLIER; CLAEREBOU, 2018).

Utilizando técnicas de contagem de larvas no pasto como principal ferramenta para avaliar o sucesso das estratégias de manejo, pesquisadores têm observado resultados interessantes. É o caso de Salles et al. (2019) que propuseram uma estratégia não química de tratamento do solo para o controle dos estágios de vida livre de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes, a qual chamaram de Econemat[®]. Tal alternativa foi desenvolvida com base no estudo onde diferentes materiais orgânicos foram inicialmente avaliados quanto às suas capacidades de inibir o desenvolvimento larval *in vitro*. Entre os materiais analisados o resíduo da mamona (*Ricinus communis*) destacou-se como potente nematicida e por ser uma boa fonte de nitrogênio. A avaliação da mamona, usando a Econemat[®] através de experimento em casa de vegetação, mostrou que o resíduo foi altamente eficiente em reduzir o número de L3/g massa seca, assim como seu uso também resultou em maior produção de biomassa e melhor qualidade da forragem. Dessa forma, os autores mostraram que o uso de adubos nematicidas no manejo integrado de controle parasitário pode constituir uma alternativa que possibilita aumentar a taxa de lotação sem, contudo, aumentar a taxa de infecção dos rebanhos.

3 JUSTIFICATIVA

A criação de pequenos ruminantes tem enfrentado grandes desafios que impedem a expansão e o desenvolvimento do sistema. Dentre os maiores entraves da produção estão os problemas de ordem sanitária, que incluem, principalmente, o acometimento dos rebanhos por helmintoses gastrintestinais. Por muito tempo, a utilização de drogas sintéticas tem sido a única estratégia de controle disponível, e isso acarreta impactos diretos sobre a eficiência dos anti-helmínticos disponíveis no mercado. Diante do uso recorrente e necessário dos vermífugos, o processo de controle torna-se cada vez mais difícil, pois o resultado dessa prática tem culminado no surgimento acelerado de parasitos resistentes.

As buscas por formas alternativas de controle das infecções mostram que produtos naturais à base de plantas constituem um campo promissor, mas que carece de informações, principalmente quanto aos compostos ativos envolvidos e às práticas de uso. *Moringa oleifera*, uma espécie de altíssimo valor biotecnológico, tem apresentado importantes propriedades anti-helmínticas. Há evidências de que as sementes dessa planta detêm compostos ativos capazes de interferir no ciclo de vida de nematoides gastrintestinais, sendo a identificação e caracterização desses compostos de relevante importância para compreensão dos mecanismos de ação envolvidos com os efeitos observados. Além disso, devido à qualidade do óleo encontrado nas sementes, que é usado para a produção de cosméticos e biodiesel, existe um interesse de expansão da cultura. Assim, torna-se relevante a caracterização e validação científica dos efeitos nematicidas de *M. oleifera*, visando o aproveitamento ecológico de seus resíduos (tortas e farelos), gerados após a retirada do óleo, de maneira que possam integrar programas de controle parasitário através da utilização de práticas mais sustentáveis.

4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- ✓ Peptídeos floculantes isolados de sementes de *Moringa oleifera* apresentam atividade anti-helmíntica *in vitro*;
- ✓ O extrato aquoso do farelo de *M. oleifera* apresenta propriedades anti-helmínticas quando administrado *in vivo* em ovinos mantidos sob dieta de elevado valor nutricional;
- ✓ A torta das sementes de *M. oleifera* apresenta um efeito adubo nematicida sobre o solo.

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

Prospectar e caracterizar peptídeos nematicidas em sementes de *Moringa oleifera* e avaliar o uso das sementes no controle de endoparasitoses em pequenos ruminantes.

5.2 Específicos

- Isolar e identificar peptídeos nematicidas em fração aquosa de sementes de *M. oleifera*;
- Verificar os efeitos floclantes dos peptídeos isolados;
- Determinar a estrutura tridimensional dos peptídeos identificados;
- Avaliar *in vivo* o potencial fitoterápico do extrato e do farelo das sementes de *M. oleifera* no tratamento de ovinos infectados com *Haemonchus contortus*;
- Avaliar o uso da torta das sementes de *M. oleifera* no solo para o controle dos estágios de vida livre de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Local de realização do estudo

As etapas experimentais deste estudo foram realizadas em instalações da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA: Unidade Caprinos e Ovinos, localizada na cidade de Sobral, Ceará; e Unidade Recursos Genéticos e Biotecnologia (Laboratório de Espectrometria de Massa), localizada na cidade de Brasília, Distrito Federal.

6.2 Material vegetal

As sementes, farelo e/ou torta das sementes de *Moringa oleifera* Lam. utilizadas no estudo foram obtidas tanto comercialmente (Empresa Biolog Atitude Sustentável, Barreirinhas-MA) quanto coletadas diretamente a partir de diferentes espécimes vegetais localizados na cidade de Sobral, Ceará (3°40'47"S 40°21'21"W). As coletas, autorizadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (Permissão #02/2008, processo 02001.008512/2011-09) e pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SISGEN (número de cadastro A76437E), foram realizadas em diferentes épocas do ano durante todo o período experimental, sendo o voucher da espécie depositado no Herbário Francisco José de Abreu Matos da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA) sob o número de registro 20.504. Previamente ao armazenamento as sementes foram submetidas à uma pré-secagem em estufa de ventilação forçada a 65 °C por 72 horas e então mantidas em câmara fria a 4 °C até o momento de uso.

6.3 Animais Experimentais

Fêmea caprina da raça Anglo-nubiana, proveniente do rebanho da Embrapa Caprinos e Ovinos, artificialmente infectada com isolado nativo (Ceará) de *Haemonchus contortus*, constituiu a fonte de fezes contaminadas para obtenção de fases de vida livre usadas nos testes de experimentação *in vitro*, *in vivo* e testes em casa de vegetação. Os experimentos *in vivo* foram conduzidos em ovinos machos da raça Santa Inês. Todos os animais utilizados no estudo foram mantidos em áreas do Campo Experimental da Embrapa e manuseados de acordo com as normas de proteção de animais experimentais preconizadas pelo *Guide for the Care and Use of Laboratory Animal, National Research Council, USA* (GCULA, 1996), com o aval da

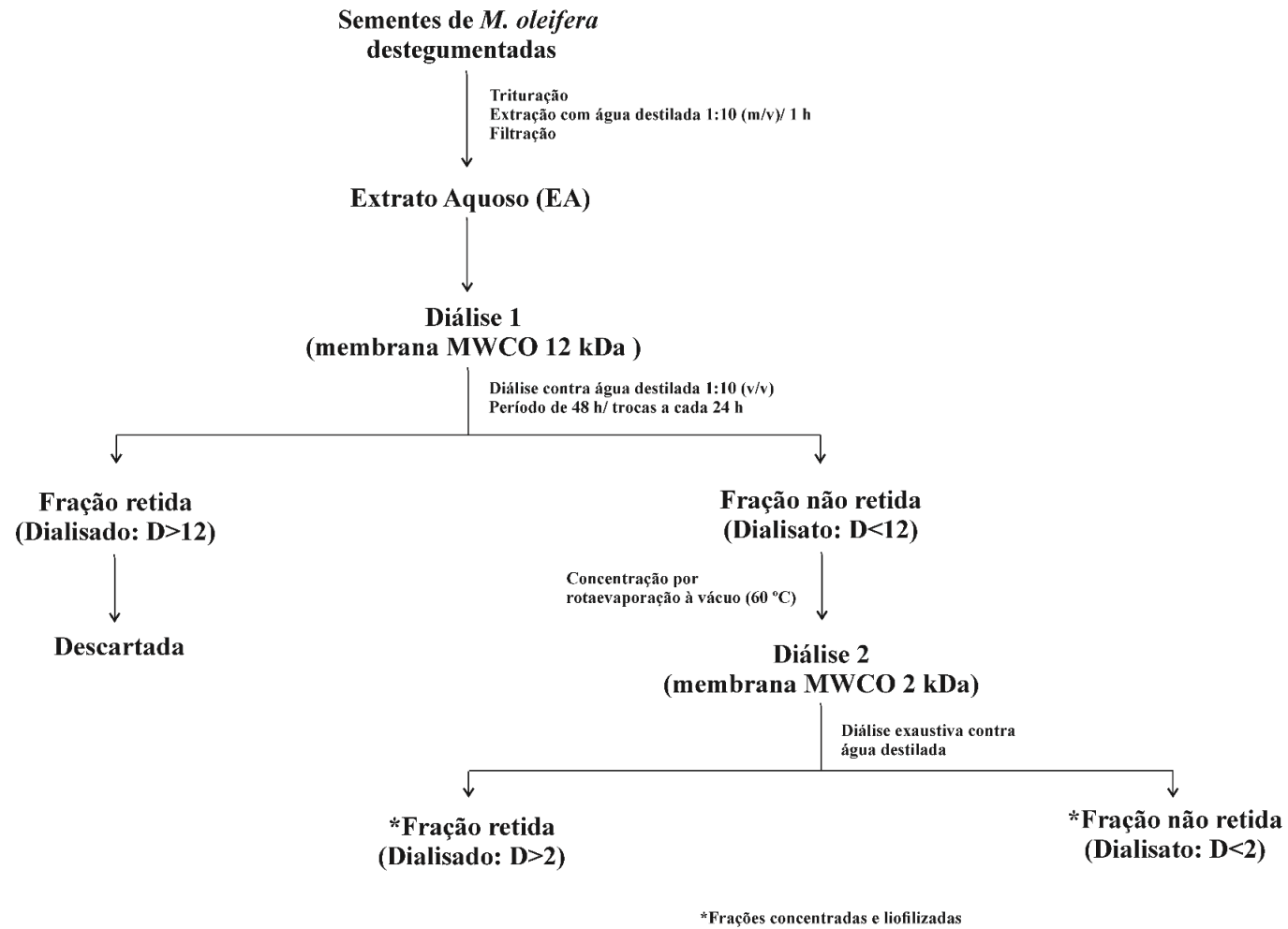
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Caprinos e Ovinos (Processo 007-2018).

6.4 Purificação, isolamento e identificação de peptídeos ativos

6.4.1 Extração e obtenção de frações proteicas

O extrato aquoso das sementes de moringa foi preparado de acordo com Salles et al. (2014), modificado por Sousa (2016). Sementes destegumentadas foram trituradas para obtenção de uma farinha fina que foi submetida à extração com água destilada (1:10; m/v) sob agitação constante à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) por 1 h. A suspensão foi filtrada através de tecido e papel de filtro. O filtrado denominado extrato aquoso (EA) foi dialisado contra água destilada na proporção de 1:10 (v/v), por 48 horas a 4°C , usando membrana com corte de peso molecular (MWCO) de 12 kDa. A fração não retida na membrana de diálise (dialisato) foi concentrada utilizando um evaporador rotativo a vácuo (modelo TE-211-Tecnal, Brasil) a 60°C e depois dialisada exaustivamente em membrana MWCO 2 kDa. O EA, as frações retida e não retida na membrana de diálise (MWCO 2 kDa), denominadas $D>2$ e $D<2$, respectivamente, foram concentrados e submetidos à determinação de proteínas solúveis utilizando o método de Bradford (1976) e depois liofilizados. O processo de extração e fracionamento descrito acima está resumido na **Figura 5**.

Figura 5 - Fluxograma do procedimento de extração e fracionamento de proteínas das sementes de *M. oleifera*



Fonte: Elaborada pela autora.

6.4.2 Caracterização por eletroforese

6.4.2.1 Eletroforese unidimensional – 1DE

Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com Laemmli (1970) em gel de separação a 12,5%. O extrato aquoso (EA) foi solubilizado em tampão Tris-HCl 0,15 M, pH 6,8, contendo 1% de SDS, 10% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol na presença de 5% de β -mercaptoetanol, aquecido a 100 °C por 5 min e centrifugado a 10.000 g/10 min. Alíquota do EA contendo 5 μ g de proteína foi aplicada ao poço. A análise das frações de baixa massa ($D > 2$ e $D < 2$) foi realizada por eletroforese desnaturante na presença de tricina (Tricina-SDS-PAGE) com gel separador de 16,5%, gel espaçador de 10% e gel de empilhamento de 4% (SCHÄGGER; VON JAGOW, 1987). As amostras (5 mg/mL) foram preparadas em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8, contendo 4% de SDS, 12% de glicerol e 0,01% de azul de Coomassie G-250 na presença de ditioneitol (DTT) 200 mM, aquecidas a 100 °C por 5 min. Foram aplicados 15 μ L/poço. Como padrões de massas moleculares foi utilizado um kit (Bio-Rad) contendo: miosina (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase B (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa), lisozima (14,4 kDa) e aprotinina (6,5 kDa). Os géis foram corados usando uma solução coloidal de Coomassie Brilliant Blue G-250 (NEUHOFF et al., 1988).

6.4.2.2 Eletroforese bidimensional – 2DE

A eletroforese bidimensional foi realizada de acordo com Görg et al. (2000) com pequenas modificações. Alíquota da fração $D > 2$ correspondente à 3 μ g de proteína foi ressuspensa em 250 μ L de solução de reidratação (ureia 7 M; tiourea 2 M; CHAPS 1%; DTT 65 mM; IPG Buffer 0,5% e azul de bromofenol a 0,002%) e em seguida carregada diretamente sobre tira de 13 cm com gradiente de pH imobilizado, faixa de pH 6-11 (GE Healthcare) e incubado por 16 h. A separação em primeira dimensão foi realizada utilizando um sistema de focalização isoelétrica Ettan IPGphor 3 sob as seguintes configurações: etapa I- 500 V, linear, 2 h; etapa II- 4000 V, gradiente, 2,5 h; etapa III- 10000 V a 18000 V-hora; etapa IV- 50 V, 0,5 h. SDS-PAGE em gel de 15% foi realizada em sistema vertical (SE 600 Ruby, Amersham Biosciences) sob condições constantes de temperatura e amperagem (50 mA/250 V/30 W). O gel foi corado com solução coloidal de Coomassie Brilliant Blue G-250 (NEUHOFF et al.,

1988). As imagens do gel foram analisadas usando o software Image Master 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare, Piscataway, EUA).

6.4.3 Purificação em cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC)

O isolamento de peptídeos ativos (Mo-HLPs) foi realizado em sistema HPLC Prominence (Shimadzu Corporation, Japão). A fração D > 2 ressuspensa em água destilada (10 mg/mL) foi carregada em coluna Phenomenex semipreparativa de fase reversa (Jupiter Proteo 4 μ m, C₁₈, 90 Å, 250 mm x 10 mm), onde um gradiente de eluição com fluxo de 2,5 mL/min foi conduzido utilizando-se solvente A (0,1% de TFA em água ultrapura) e solvente B (0,1% de TFA em acetonitrila 100%) conforme segmentação: 5-5% B de 0 a 10 min; 5-65% B de 10 a 65 min; 65-95% B de 65 a 70 min e 95-95% B de 70 a 80 min. O eluato foi monitorado a 216 e 280 nm, sendo as frações obtidas coletadas manualmente, recromatografadas sob gradiente de 5-80% de B em 45 min e liofilizados, usando um concentrador a vácuo (SpeedVac, Labconco), para análises posteriores.

6.4.4 Análises por espectrometria de massa e sequenciamento de Mo-HLPs

Avaliações de massa molecular dos constituintes de D > 2 utilizando LC-ESI-Q-TOF/MS foram obtidas por infusão direta da amostra reconstituída em acetonitrila:água (1:1) contendo ácido fórmico a 0,1%. A análise foi realizada utilizando espectrômetro de massa Impact IITM (Bruker Daltonics, Bremen - Alemanha) controlada pelo software Bruker otofControl. Os espectros foram obtidos em modo íon positivo e faixa de m/z entre 100 e 2500. Software Compass DataAnalysis 4.3.110 (Bruker Daltonics, Bremen - Alemanha) foi usado para processamento e análise de dados.

Sequenciamento por MALDI com fragmentação In-Source-Decay (MALDI-ISD) utilizando matriz 1,5-diaminonaphthalene (DAN) foi realizado para caracterização prévia dos Mo-HLPs purificados por RP-HPLC. Os peptídeos foram dissolvidos em água/TFA 0,1% e misturados à solução saturada de matriz na proporção de 6:1 (v/v). Sequências parciais N- e C-terminal dos peptídeos intactos foram determinadas por interpretação manual dos espectros MALDI-ISD usando o programa FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics).

Análise proteômica através de abordagem bottom-up foi conduzida, porém apenas para a isoforma peptídica de maior rendimento: Mo-HLP3. Os processos de redução com DTT e S-alquilação com Iodoacetamida (IAA) foram realizados como descrito por GUNDRY et al.

(2009). Mo-HLP3 foi previamente incubado com DTT 500 mM em bicarbonato de amônio 100 mM (NH_4HCO_3 – pH 7.5) a 70 °C por 1 hora, 500 rpm. Em seguida, a uma concentração final de 500 mM foi adicionado IAA às moléculas reduzidas e a reação foi mantida a 37 °C, na ausência de luz, por mais 1 hora a 500 rpm. A amostra reduzida e S-alquilada foi dessalinizada por RP-HPLC em coluna analítica Vydac (Dionex 5 μm , C_{18} , 300 Å, 250 mm x 4.6 mm) e liofilizada. Para determinar o número de resíduos de cisteínas presentes, as moléculas foram analisadas por MALDI-TOF-MS sob diferentes condições: amostra em estado nativo; amostra reduzida; amostra reduzida e S-alquilada. Alterações de massa resultantes do aumento de +2.02 e +57.05 Da foram consideradas para detecção de cada ponte dissulfeto removida e para cada grupo sulfidril alquilado com IAA, respectivamente (WU; ENGEN, 2004).

Mo-HLP3 reduzido e S-alquilado (1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foi submetido à digestão com tripsina (Trypsin Sequencing Grade from bovine pancreas - Sigma-Aldrich). A reação ocorreu a 37 °C por 24 horas. Após esse período, a amostra foi liofilizada e avaliada por MALDI-TOF-MS e os peptídeos separados em sistema UFLC Prominence (Shimadzu Corporation, Japão), utilizando coluna analítica Shim-pack XR-ODS (C_{18} , 2.0 mm x 30 mm) em gradiente de 5-80% B (onde, B: 0,1% de TFA em acetonitrila 100%) durante 25 min.

Todos os espectros de massa foram adquiridos em espectrômetro modelo Ultra FleXtreme MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics) em modo positivo linear e/ou refletido. As amostras foram solubilizadas em matriz de α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) na proporção de 1:3 (amostra:matriz) e os espectros obtidos foram processados usando o programa FlexAnalysis versão 3.3 (Bruker Daltonics).

6.5 Análises de bioinformática

As sequências dos Mo-HLPs foram comparadas com sequências de referência armazenadas em banco de dados de proteínas não redundantes do National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool_protein). O alinhamento múltiplo das sequências primárias de aminoácidos foi realizado usando o programa MEGA software versão 6 (www.megasoftware.net).

6.6 Predição *in silico* das estruturas tridimensionais de Mo-HLPs

6.6.1 Modelagem por homologia

Após determinação das sequências dos Mo-HLPs as estruturas primárias obtidas foram submetidas à modelagem molecular utilizando o Modeller versão 9.20, um *software* escrito na linguagem Python, disponível gratuitamente e amplamente utilizado para homologia ou modelagem comparativa de estruturas protéicas tridimensionais. O referido processo de modelagem foi realizado seguindo quatro etapas principais: (1^a) procura por sequências de proteínas homólogas; (2^a) comparações das sequências alvo com as sequências moldes de elevada identidade; (3^a) alinhamento das sequências alvos e sequências modelos; (4^a) construção, otimização e validação dos modelos estruturais gerados.

6.6.1.1 Procura por sequências homólogas

Para a construção de um modelo molecular, o programa Modeller utiliza moldes de uma ou mais proteínas, que já tenham seus modelos tridimensionais determinados e validados experimentalmente, depositados no PDB (do inglês, *Protein Data Bank*). Assim, nessa primeira etapa foram preparados arquivos de entrada específicos (extensão ALI) contendo as sequências das diferentes isoformas de Mo-HLPs obtidas por espectrometria. Em seguida, as sequências alvo processadas para formato PIR, legível pelo Modeller, foram analisadas através da busca por sequências relacionadas que apresentassem estruturas conhecidas. Essa análise comparativa ocorre a partir de um arquivo extraído do Modeller, contendo todas as sequências de moléculas oriundas do PDB (*pdball.pir*). Essa etapa é finalizada com a execução do arquivo “build_profile.py”.

6.6.1.2 Comparações das sequências alvo com as sequências moldes

Como resultado da etapa anterior, arquivos log “build_profile.log” foram gerados para aferição da identidade de cada sequência das moléculas homólogas encontradas. Ainda nessa fase, arquivos “build_profile.prf” foram produzidos possibilitando, além da análise de identidade das sequências, checagem dos valores de E-value e das sequências proteicas alinhadas. Após seleção das moléculas com elevada identidade/similaridade de sequência e E-

value mais próximos a zero, arquivos “compare.py” foram preparados e executados. Arquivo “compare.log” legível contendo o comando *ID_table* com distâncias de sequências das moléculas emparelhadas foram usados para construção de dendograma e geração da matriz de distância em pares responsável pela distinção entre moléculas candidatas a molde.

6.6.1.3 Alinhamento das sequências alvo e sequências modelos

A partir da escolha da molécula molde com maior nível de identidade de sequência, além de outros parâmetros, como *wwwPDBValidation* e comprimento da sequência, arquivo “Align2d.py” foi preparado e executado, realizando-se assim o alinhamento das sequências alvo e modelo, onde foram levadas em consideração informações estruturais do modelo. Além de outros arquivos legíveis, foi construído um arquivo simplificado na extensão PAP para inspeção do alinhamento das sequências, em que todas as posições idênticas são marcadas com “*”.

6.6.1.4 Construção, otimização e validação dos modelos construídos

Uma vez concluído o alinhamento, a etapa de construção de modelos foi realizada através de configuração do Modeller para o cálculo de 100 modelos tridimensionais homólogos à proteína alvo. A seleção do modelo predito mais fidedigno foi otimizada e validada por meio da conferência dos valores de *score* DOPE (do inglês: *Discrete Optimized Proteins Energy*) a partir dos 100 modelos de PDBs construídos. O modelo escolhido para cada molécula alvo foi aquele que apresentasse o maior valor negativo para DOPE, ou seja, maior energia DOPE dada em módulo.

A construção da estrutura predita selecionada foi realizada utilizando-se o programa UCSF CHIMERA versão 1.14 (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>). Sobreposições dos modelos definidos foram usadas para evidenciar diferenças estruturais entre as moléculas analisadas e verificar a existência de similaridade aceitável e compatível com os dados observados nas etapas anteriores, especialmente em regiões com elevado grau de conservação.

6.7 testes de atividades *in vitro*

6.7.1 Teste de atividade flocculante

Água turva sintética foi previamente preparada para realização de ensaios de microfloculação. Uma suspensão aquosa de argila a 1% (p/v) foi mantida sob agitação por 30 minutos e deixada em repouso por 24 horas para completa hidratação. Posteriormente, o sobrenadante foi analisado através de absorvância (Abs) a 500 nm (espectrofotômetro UV-visível Biochrom Libra S12) e níveis de turbidez entre 0,6 e 0,8 unidades de absorvância foram considerados ideais para os experimentos (GHEBREMICHAEL et al., 2005). A fração $D > 2$ (1 mg) e Mo-HLPs (5 e 10 μg), ambos previamente liofilizados, foram ressuspensos em volumes de até 25 μL de água destilada e tiveram suas capacidades flocculantes avaliadas após serem adicionados a cubetas de polipropileno contendo solução de argila (volume final para 1 mL). As misturas foram imediatamente homogeneizadas por inversão e mantidas em repouso por 2 horas. Durante a primeira hora a Abs 500 nm foi registrada a cada 5 minutos, passando a intervalos de 10 minutos no tempo remanescente. Sulfato de alumínio 50 mg/mL (10 μL) foi usado como controle positivo. A atividade flocculante foi avaliada através de redução no valor de absorvância a partir da solução inicial. A porcentagem de flocculação foi calculada considerando a densidade óptica (OD_{500}) inicial das amostras (tempo zero) como 100% de turbidez.

6.7.2 Atividade anti-helmíntica

6.7.2.1 Obtenção das fases de vida livre de nematoides GI

Ovos frescos de nematoides GI foram recuperados a partir das fezes de animal infectado (seção 4.3) seguindo metodologia descrita por Bizimenyera et al. (2006) com modificações. O material fecal coletado diretamente do reto e apresentando ovos por grama de fezes (OPG) superior à 3.000 foi processado por maceramento em água e filtrações sucessivas em tamises com malhas de granulações decrescentes (1 mm; 0,105 mm; 0,055 mm e 0,025 mm). O produto retido na última etapa de filtração (0,025 mm) foi recuperado, centrifugado (1000 g/ 5 min) e ao precipitado resultante foi adicionada solução saturada de açúcar (densidade=2,38 g/mL) para flutuação dos ovos. Após nova centrifugação nas mesmas condições citadas, os ovos presentes no sobrenadante foram recuperados por retenção (tamis 0,025 mm), lavados e ressuspensos em

água destilada para realização de contagem e ajuste do número de ovos/volume a serem utilizados nos testes *in vitro*.

Larvas de terceiro estágio (L3 – infectante) foram obtidas através da técnica de coprocultura realizada de acordo com método de Roberts e O’Sullivan (UENO; GONÇALVES, 1998). Fezes (OPG > 3.000) maceradas e umedecidas foram acondicionadas em frascos aerados e mantidas à temperatura ambiente por 7 dias. Decorrido esse período, as L3 presentes foram recuperadas mediante preenchimento dos frascos com água e inversão dos mesmos sobre placas de petri, aguardando-se o tempo de 3 a 4 horas para transição das larvas a partir das fezes até a lâmina d’água contida nas placas. As larvas coletadas foram identificadas e armazenadas a 4 °C até o uso.

6.7.2.2 Teste de eclosão de ovos

Efeitos ovicidas foram avaliados através de ensaios de eclodibilidade seguindo metodologia preconizada por Coles et al. (1992) com adaptações. Ovos de nematoides (n=100) foram distribuídos em poços de placas de cultivo e incubados com diferentes tratamentos: fração D > 2 (0,2 mg de proteína/mL); Mo-HLPs (6,4 mg/mL); EAF-Mo (100 mg de massa/mL). Tiabendazol (0,1 mg/mL) foi utilizado como controle positivo e água destilada e DMSO 0,03% foram usados como controles negativos. O volume final de ensaio foi de 0,5 mL/poço. Após homogeneização, as placas foram mantidas à temperatura ambiente (25 - 27°C) por 24 horas e o processo de eclosão foi então interrompido por adição de formol 5%. A contagem do número de ovos e larvas de primeiro estágio (L1) foi realizada por visualização em microscópio invertido (aumento de 100x). Os testes foram realizados em triplicata e as porcentagens de eclosão e de inibição da eclosão foram calculadas utilizando as seguintes equações: **% eclosão** = $100 * (\text{número de L1} / \text{número de ovos} + \text{número de L1})$; **% inibição da eclosão** = $100 - ((\% \text{ eclosão dos tratamentos} / \% \text{ eclosão do controle negativo}) * 100)$.

6.7.2.3 Minicoproculturas

Os efeitos sobre diferentes fases de vida livre dos parasitos foram avaliados seguindo os princípios da técnica de coprocultura com modificações na quantidade de fezes e no volume de água conforme descrito por Salles et al. (2018). As chamadas minicoproculturas foram realizadas em frascos de 5 mL contendo 1 ou 2 gramas (g) de fezes contaminadas por ovos de

nematoides ($OPG \leq 3000$). Às fezes foram adicionadas diferentes quantidades de tratamentos em pó (Torta de moringa T-Mo) obedecendo relações que variaram entre 0,01:1 a 1:1 (g de tratamento: g de fezes). Fezes incubadas na ausência da T-Mo foram utilizadas como controle negativo. Os sólidos foram umedecidos utilizando volumes de água iguais ao dobro do peso em gramas (2 mL de água/g de sólido). Após sete dias de cultivo à temperatura ambiente foi realizado o processo para recuperação e contagem das larvas, sendo o resultado expresso em L3/g de fezes. A eficiência nematicida (EN) foi calculada conforme a equação: $EN = 100 - ((\text{número de L3 por g de fezes dos tratamentos} / \text{número de L3 por g de fezes do controle negativo}) * 100)$.

6.7.2.4 Teste de inibição da migração larval

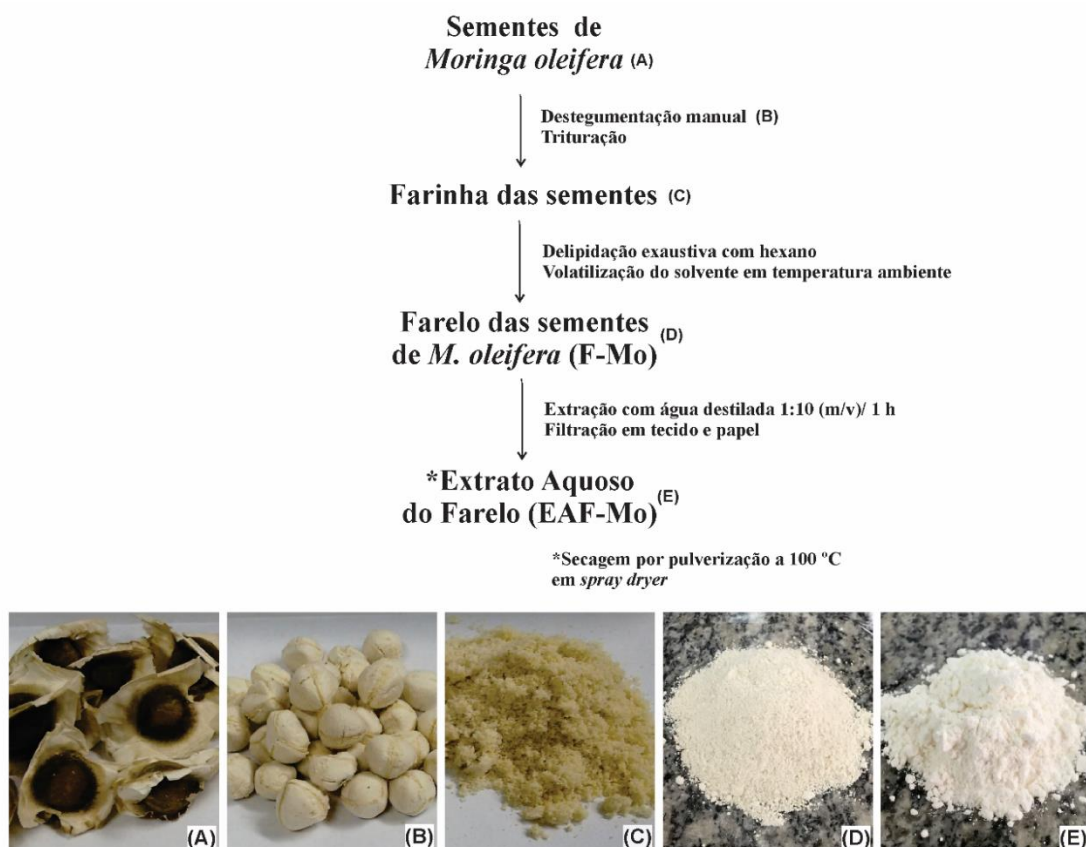
Larvas infectantes (L3) sem bainha foram submetidas ao teste de migração seguindo princípios do método descrito por Demeler et al. (2010). O desembainhamento foi promovido por imersão das larvas em solução de hipoclorito 2% até que fosse obtida aproximadamente 90% de L3 sem bainha. Em seguida, as larvas foram lavadas em água destilada por três vezes mediante centrifugação a 1000 g por 2 min. A separação de larvas móveis foi realizada por deposição das L3 sobre peneira (malha de 25 μm) submersa em água por 1 hora, seguida por recuperação e estimativa do número de larvas/volume. Em placas de cultivo com volume final para 1 mL, cerca de 100 L3 foram incubadas com o EAF-Mo (50 mg/mL) permanecendo em contato por períodos distintos de 4 e 24 horas. Larvas em água destilada foram utilizadas como controle negativo. Decorrido o tempo de contato, o material (larvas + extrato) foi completamente transferido para novos poços contendo 1 mL de água e peneiras com malha de 25 μm acopladas de modo que o fundo estivesse totalmente submerso. Após mais 24 horas de incubação foi realizada a contagem do número de L3 que migraram através das peneiras e das L3 que permaneceram retidas. A percentagem de inibição da migração foi calculada utilizando as seguintes equações: **% de migração** = $100 * (\text{número de L3 que migraram} / \text{número de L3 que migraram} + \text{número de L3 que ficaram retidas})$; **% de inibição da migração** = $100 - ((\% \text{ de migração dos tratamentos} / \% \text{ de migração do controle negativo}) * 100)$.

6.8 Atividade anti-helmíntica *in vivo*

6.8.1 Preparo do material vegetal avaliado como fitoterápico

Sementes de moringa foram previamente processadas para obtenção do farelo das sementes (F-Mo) e do extrato aquoso do farelo (EAF-Mo), materiais que foram administrados aos animais sob a forma de suspensão e por via oral para avaliação de seus potenciais fitoterápicos (**Figura 6**). O processamento seguiu os mesmos passos iniciais descritos na secção 4.4.1 acrescido da etapa de delipidação da farinha das sementes utilizando hexano como solvente. O produto desengordurado e após completa volatilização do solvente originou o F-Mo em pó, sendo uma parte desse material reservada e outra utilizada para produção do EAF-Mo. O EAF-Mo obtido a partir da farinha do farelo foi então submetido à secagem por pulverização a 100 °C em *spray dryer* e ambos produtos sob a forma de pó foram armazenados em temperatura ambiente até o momento do uso.

Figura 6 - Beneficiamento de sementes de *Moringa oleifera* para avaliação de efeitos fitoterápicos *in vivo*.



Fonte: Elaborada pela autora.

6.8.2 Tratamento e Manejo alimentar

Ovinos da raça Santa Inês (n=36), machos, com idades entre sete e oito meses, peso vivo médio de $28 \pm 0,1$ Kg e livres de infecção foram selecionados para os testes de experimentação *in vivo* (**Figura 7**).

Figura 7 - Ovinos Santa Inês utilizados no experimento.



Fonte: Elaborada pela autora.

Para o experimento foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com 4 tratamentos e 9 repetições. Dessa forma, as trinta e seis unidades experimentais foram distribuídas randomicamente em quatro grupos de nove animais cada, sendo os tratamentos identificados da seguinte maneira: G1- Grupo tratado com Oxfendazol (OXF - 2,5 mg/Kg); G2- Grupo tratado com F-Mo (250 mg/Kg); G3- Grupo tratado com EAF-Mo (250 mg/Kg) e G4- Grupo infectado não tratado (**Figura 8A**).

Período de 30 dias antes do início dos tratamentos, designado de fase preparatória, foi destinado à realização de infecção artificial e adaptação dos animais à dieta específica (**Figura 8B**). A infecção experimental foi realizada através da administração, por via oral, de uma suspensão larval contendo 2.500 larvas (L3) de nematoides gastrintestinais obtidas por coprocultura (seção 4.7.2.1), sendo realizados exames coprológicos após o período pré-patente de 21 dias para confirmar o estabelecimento da infecção parasitária. Quanto à alimentação, uma dieta especial de alto concentrado (DAC) foi utilizada. A ração foi formulada conforme recomendações do *Nacional Research Council* (NRC, 2007) com relação PB:NDT (14%:67%) adaptada por Miranda (2018), e relação volumoso:concentrado de 42,45:57,55. Feno de capim

tifton 85 (521,34 g/animal/dia) constituiu a fonte de fibras, sendo os demais ingredientes da dieta compostos por milho 43,32% (532,08 g/animal/dia), farelo de soja 13,75% (168,83 g/animal/dia) e calcário 0,48% (5,94 g/animal/dia). A DAC foi fornecida aos animais respeitando um período prévio de adaptação por 14 dias seguindo o modelo de escada (ROGÉRIO et al., 2018). Nos primeiros quatro dias da fase de adaptação foram fornecidos 50% do total de concentrado, em seguida, aumentou-se a quantidade para 70% durante seis dias, e nos últimos quatro dias os 100% da quantidade de concentrado da dieta foram atingidos. Durante todo o experimento, a dieta formulada foi oferecida diariamente aos animais sendo dividida em duas refeições, às 8 h (50% do total diário) e às 13 h (50% do total diário). Sobras diárias/grupo foram contabilizadas e retiradas sempre pela manhã, antes da primeira refeição, para garantir que fossem mantidas em torno de 5%.

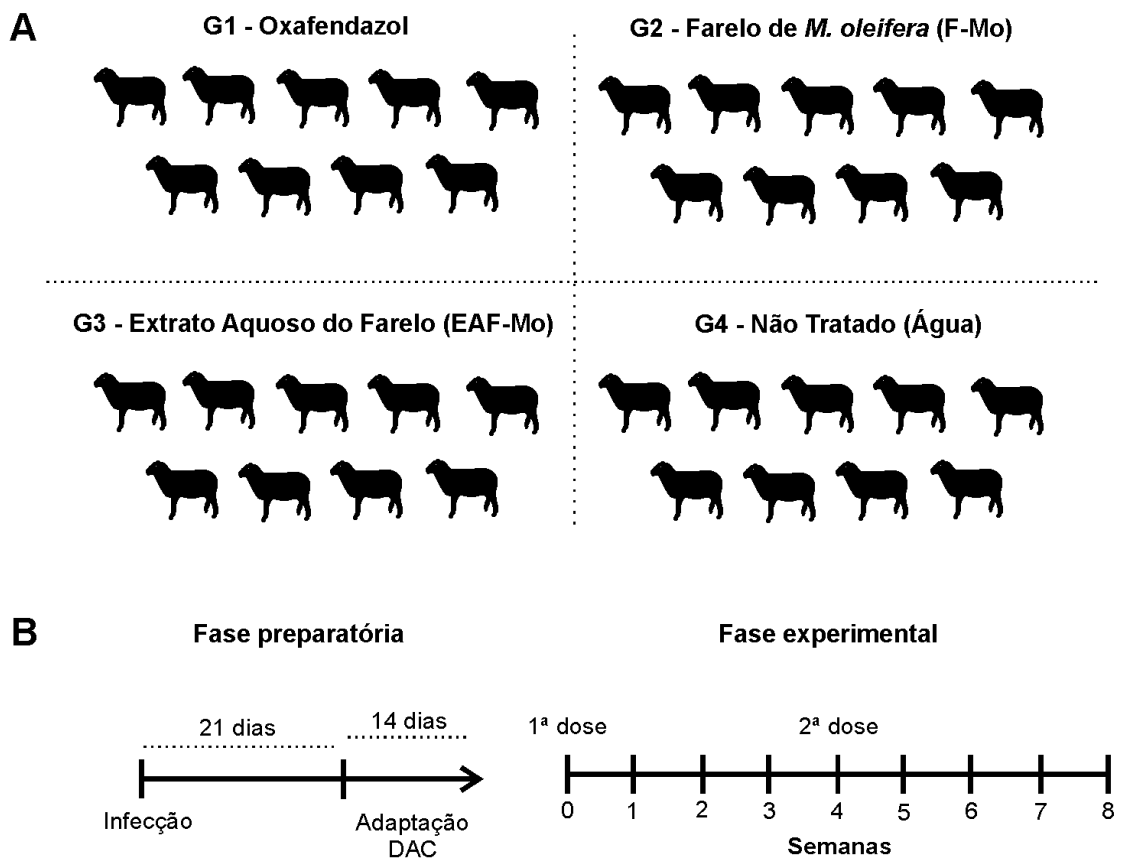
Imediatamente após a fase preparatória iniciou-se a fase experimental, conduzida durante as oito semanas seguintes (**Figura 8B**). A fase experimental consistiu na administração dos tratamentos e controle em duas doses orais intervaladas por um período de quatro semanas: 1ª dose – semana zero e 2ª dose – semana quatro. Em cada um dos dois momentos, após jejum de 16 horas, G1 recebeu uma dosagem de oxfendazol em suspensão conforme recomendada pelo fabricante: 2,5 mg/Kg, G2 e G3 receberam uma solução aquosa de 250 mg/Kg preparadas a partir do pó do F-Mo e EAF-Mo, respectivamente (**Figura 9**), e G4 recebeu apenas água destilada em volumes de 20 mL. O intervalo de coleta de dados foi semanal, totalizando nove momentos de observações (semana 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) nos quais foram avaliados parâmetros clínicos, parasitológicos e hematológicos.

6.8.2.1 Análises Bromatológicas

Amostras de moringa (farelo e extrato) e de ingredientes da dieta fornecida aos animais foram previamente analisadas quanto à composição químico-bromatológica. Após pré-secagem em estufa de ventilação forçada a 65 °C por 72 horas, os materiais foram submetidos à determinação dos teores de matéria seca (MS), em estufa a 105 °C - método nº 934.01, matéria orgânica (MO) - método nº 942.05 - e material mineral (MM) de acordo com *Association of Official Analytical Chemists* – AOAC (HELDRICH, 1990). Conteúdos de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), celulose (CEL), hemicelulose (HCEL) e lignina (LIG) foram determinados de acordo com o método de Van Soest et al. (1991). Determinação do extrato étereo (EE) foi realizada através da tecnologia de bolsas filtrantes (filter bag technology) utilizando solvente à alta temperatura (hexano/90 °C por 2 horas) em

extrator de gordura Ankom® (XT 15); e o teor de proteína bruta (PB) foi obtido indiretamente a partir do valor de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl utilizando o valor de 6,25 como fator de correção conforme procedimentos da *Association of Official Analytical Chemists* – AOAC (LATIMER JUNIOR, 2016). As análises foram realizadas em triplicata e os valores expressos em porcentagem com base na matéria seca (Tabela 2).

Figura 8 - Delineamento experimental para avaliação *in vivo* de atividade anti-helmíntica das sementes de *M. oleifera*.



A- Distribuição dos animais. B- Marcos temporais e eventos realizados durante o período de estudo.

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 9 - Preparo e administração dos tratamentos.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2 - Composição químico-bromatológica dos principais ingredientes da dieta experimental de alto concentrado (DAC) e dos produtos do processamento das sementes de *Moringa oleifera*

| | Ingredientes DAC | | | <i>Moringa oleifera</i> | |
|-----------------|------------------|-------|----------------|-------------------------|--------|
| | Feno Tifton 85 | Milho | Farelo de soja | F-Mo | EAF-Mo |
| MS (%) | 89,3 | 89,3 | 88,8 | 89,5 | 84,2 |
| MO (%) | 89,9 | 97,8 | 92,9 | 93,1 | 87,8 |
| PB (%) | 10,1 | 8,3 | 46,8 | 58,4 | 30,1 |
| MM (%) | 10,1 | 2,2 | 7,1 | 6,9 | 12,2 |
| EE (%) | 10,3 | 5,5 | 1,5 | 11,9 | 11,6 |
| FDN (%) | 93,3 | 12,1 | 21,1 | 13,1 | 0,0 |
| FDA (%) | 49,7 | 2,7 | 10,0 | 5,9 | 0,0 |
| CEL (%) | 29,5 | 9,4 | 11,2 | 4,0 | 0,0 |
| HCEL (%) | 43,6 | 2,5 | 9,7 | 7,2 | 0,0 |
| LIG (%) | 18,8 | 1,3 | 2,5 | 3,6 | 0,0 |

MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; MM: matéria mineral; EE: extrato etéreo; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; CEL: celulose; HCEL: hemicelulose; LIG: lignina. F-Mo: Farelo de *M. oleifera*; EAF-Mo: Extrato Aquoso do Farelo.

Fonte: Elaborada pela autora.

6.8.3 Exames clínicos: peso, escore de condição corporal e grau FAMACHA[©]

O monitoramento do estado nutricional dos animais foi realizado através de medidas objetivas de variação do peso e subjetivas por avaliação do escore de condição corporal (ECC). O peso foi determinado utilizando balança digital enquanto a condição corporal foi avaliada de maneira visual e pela palpação de pontos anatômicos específicos, sendo atribuídos escores variando de 1 (muito magro) a 5 (muito gordo).

Sinais clínicos indicativos de anemia foram acompanhados através de observações da coloração da mucosa ocular dos animais, sendo classificadas em uma das cinco categorias de acordo com tabela de cores utilizando cartão FAMACHA[©]: 1 = vermelho, não anêmico; 2 = vermelho-rosado, não anêmico; 3 = rosado, levemente anêmico; 4 = branco-rosado, anêmico; 5 = branco-pálido, severamente anêmico (VAN WYK; BATH, 2002).

6.8.4 Exames parasitológicos: contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e coprocultura

Análise coprológica para determinação do número de ovos por grama de fezes foi realizada através da técnica de McMaster de Gordon e Whitlock (UENO; GONÇALVES, 1998). As fezes dos animais, coletadas semanalmente durante a fase experimental, foram pesadas e maceradas utilizando-se 2 g de fezes com adição de 58 mL de solução hipersaturada de açúcar (densidade=2,38 g/mL). Essa suspensão foi filtrada em tamis de 80 malhas por polegada, homogeneizada e utilizada para o preenchimento dos dois lados da câmara de McMaster. Após contagem sob microscópio óptico, o número de ovos encontrados foi multiplicado por fator de correção (x100), sendo o resultado final expresso em ovos por grama de fezes (OPG).

A viabilidade dos ovos eliminados nas fezes dos animais foi avaliada utilizando a técnica de minicoproculturas. Para isso, partes iguais de fezes de animais do mesmo tratamento foram reunidas para formação de quatro pools distintos correspondentes a cada um dos grupos experimentais (G1, G2, G3, G4). Após maceração, 3 g de fezes em triplicata foram acondicionadas em tubos de 5 mL, umedecidas com 2 mL de água e mantidas em temperatura ambiente por sete dias. Larvas recuperadas foram contabilizadas e os resultados expressos em números de L3 totais.

6.8.5 Exames hematológicos: volume globular (VG) e proteínas plasmáticas totais (PPT)

As coletas do material sanguíneo foram realizadas por punção da veia jugular dos animais utilizando um sistema de agulha acoplada a tubos à vácuo contendo EDTA. Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue foram levadas ao laboratório para determinação do volume globular (VG) e das proteínas plasmáticas totais (PPT). O percentual de VG foi determinado utilizando a técnica do microhematócrito descrita por JAIN (1993), onde tubos capilares preenchidos com o sangue foram centrifugados por 10 minutos a 12.000g, prosseguindo com leitura comparativa utilizando tabela apropriada. A concentração plasmática de proteínas totais foi determinada por refratometria (WOLF et al., 1962). De modo sequencial, após determinação do VG, o capilar contendo o sangue já fracionado foi quebrado acima da porção leucocitária e gotas do plasma foram colocadas sobre refratômetro para realização da leitura das PPT em dL/cm³.

6.9 Atividade de moringa utilizando a ECONEMAT[®]

O desenvolvimento de forragem e o nível de contaminação da mesma por nematoides em resposta ao uso de moringa no solo foram avaliados sob condições controladas de temperatura (30 °C) e umidade (74%) em casa de vegetação. Para os testes foi escolhida a espécie forrageira *Megathyrus maximus* cv. tanzânia, cujas sementes foram semeadas em vasos. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos e 10 repetições, totalizando 40 parcelas.

Cada vaso foi preenchido com cerca de 5 kg de substrato elaborado a partir de areia e esterco caprino (1:2) que foi previamente esterilizado por autoclavagem a 121 °C por 30 min (**Figura 10A**). Para o plantio do capim-tanzânia foi realizada semeadura direta no solo/substrato onde punhados de sementes foram depositados em quatro sulcos equidistantes e a cerca de 0,5 cm de profundidade (**Figura 10B**).

Figura 10 – Preparação dos vasos para realização do experimento em casa de vegetação.



A- Esterilização do substrato. B- Plantio do capim-tanzânia em vasos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após cinquenta e seis dias da semeadura foi realizado um desbaste manual dos perfilhos e uma poda de uniformização das folhagens com cortes a 20 cm do solo. Em seguida, o solo de todos os vasos recebeu adubação química de manutenção conforme recomendações da Comissão de Fertilidade de Solos do estado de Minas Gerais (RIBEIRO et al., 1999). A adubação foi realizada por adição de três compostos contendo macro e micronutrientes essenciais: (i) supersimples (fonte de fósforo), (ii) FTE BR-12 (fonte de enxofre, boro, cobre, manganês e zinco) e (iii) cloreto de potássio (fonte de potássio) (**Figura 11**).

Figura 11 - Poda e adubação química do capim-tanzânia aos 56 dias após semeadura.

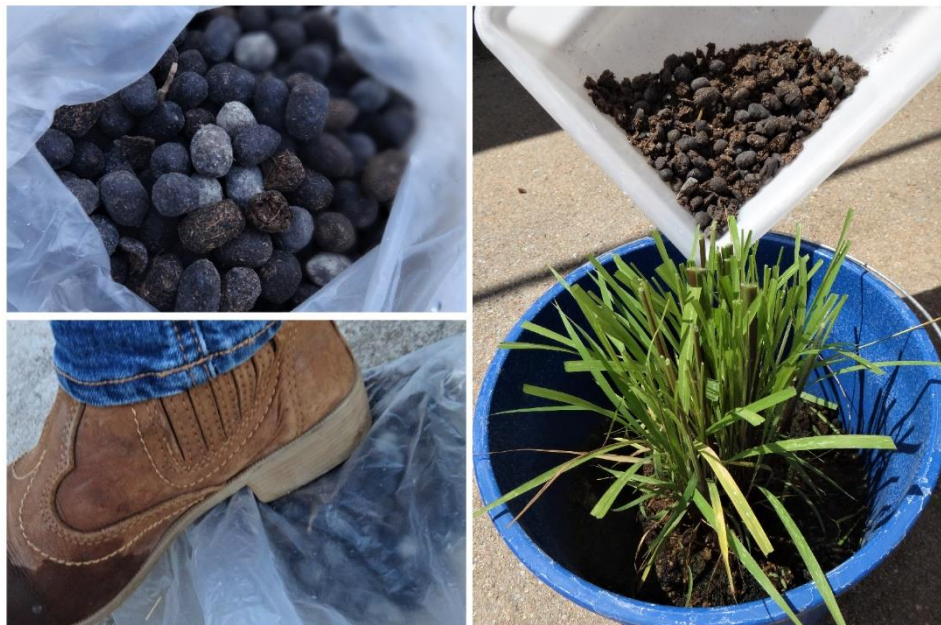


Fonte: Elaborada pela autora.

Imediatamente após à fertilização os solos de todos os vasos foram contaminados com 50 g de fezes pisoteadas (**Figura 12**), coletadas ao longo de 15 dias a partir de cabra naturalmente infectada contendo número conhecido de ovos por grama de fezes ($OPG \leq 2000$). As fezes foram diariamente recolhidas com o uso de bolsas coletoras, armazenadas intactas à temperatura ambiente e o pool gerado ao final do período de coleta foi misturado homogeneamente antes do uso.

Os diferentes tratamentos avaliados no experimento consistiram na adição da farinha de Torta de Moringa comercial (T-Mo - Biolog[®]) em dosagens crescentes. As doses utilizadas foram previamente determinadas a partir de testes *in vitro* em minicoproculturas (seção 4.7.2.3), onde foram testadas diferentes relações fezes:T-Mo. Assim, foi estabelecido que em cada 25 % dos vasos (10 unidades) fossem aplicados uniformemente na superfície do solo já contaminado: 0, 12.5, 25 e 50 g da farinha da T-Mo, equivalente às relações (1:0), (1:1/4), (1:1/2) e (1:1). Em seguida, o solo de cada vaso foi irrigado com o dobro de água (mL), considerando o volume de material seco adicionado em gramas (fezes ou fezes + T-Mo), onde o grupo sem adição de torta (T0) recebeu 100 mL e os grupos tratados T12.5, T25 e T50 receberam, respectivamente, 125, 150 e 200 mL de água (**Figura 13**).

Figura 12 - Contaminação do solo com fezes contendo ovos de nematoides GI .



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 13 - Adição de Torta de Moringa ao solo contaminado.



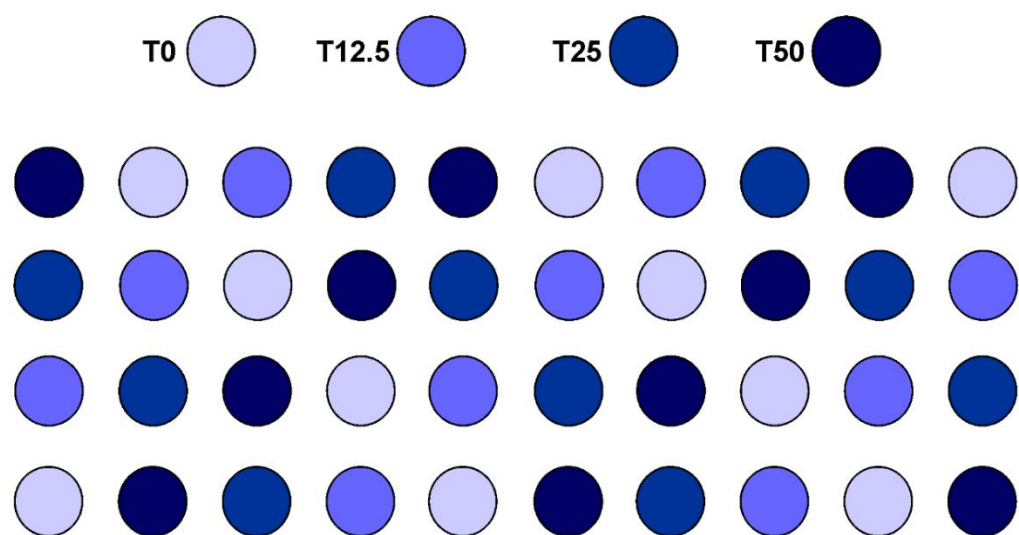
Fonte: Elaborada pela autora.

Após as etapas de contaminação e tratamento, descritas acima, as unidades experimentais foram dispostas na casa de vegetação de modo que cada tratamento fosse regularmente distribuído por toda a área utilizada a fim de evitar intervenções por fatores locais do ambiente (**Figura 14**). O sistema de irrigação durante o experimento foi programado para manter nos vasos uma lâmina d'água de 3 mm, para isso, foram realizadas quatro irrigações ao longo do dia: às 9 h, 13:30 h, 15:30 h e às 17 h, com duração de 3 minutos cada.

Vinte e oito dias após o tratamento do solo foram realizadas análises tanto para avaliar o efeito da T-Mo sobre o desenvolvimento das plantas, quanto sobre sua capacidade de reduzir o número de L3 na forragem. A análise de desenvolvimento das plantas em condições de vaso foi avaliada através da eficiência fotossintética observada pela intensidade do verde das folhas (Índice Relativo de Clorofila – IRC), sendo realizada com o auxílio de um medidor digital de clorofila SPAD-502 (*Soil Plant Analysis Development*, Minolta, Japão). As leituras com o SPAD foram feitas no terço médio do limbo foliar, ao lado da nervura central e na face adaxial em ponto único de quatro folhas distintas por planta (**Figura 16**). Os IRCs foram expressos como a média das leituras por planta e por tratamento. Após isso, as folhagens de cada planta

foram coletadas através de corte a cerca de 2 cm do solo (**Figura 15**), depositadas em recipientes individuais e levadas ao laboratório para análises seguintes.

Figura 14 - Distribuição dos vasos em casa de vegetação.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 15 - Capim-tanzânia ao final do estudo: medição do IRC e coleta da parte aérea total das plantas.

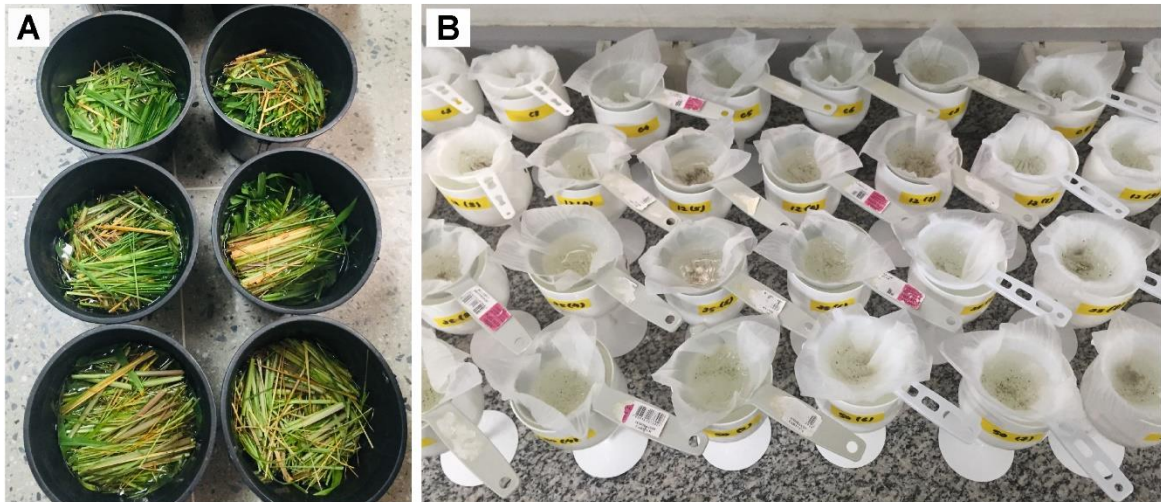


Fonte: Elaborada pela autora.

O nível de contaminação das plantas com nematoides GI foi avaliado a partir da recuperação de larvas presentes nas folhagens com metodologia fundamentada na técnica de Baermann (UENO; GONÇALVES, 1998), adaptada por Salles et al. (2014b) e com modificações. As amostras de capim foram submetidas à lavagem inicial por submersão em 2 L de solução aquosa contendo detergente neutro (0,125 mL/L) por 4 horas, seguida por uma troca de mesmo volume e deixada novamente em repouso por mais 3 horas, totalizando assim sete hora de imersão e quatro litros de solução utilizados (**Figura 16A**). O volume total de solução usada na lavagem foi filtrado utilizando uma peneira com malha de 0,025 mm para retirada do detergente e recuperação das larvas que foram imediatamente depositadas sobre peneiras recobertas com lenços de papel e apoiadas sobre cálices já preenchidos com água de modo a permitir a migração e decantação das mesmas após um período de 12 horas (**Figura 16B**). As larvas sedimentadas foram coletadas e quantificadas com auxílio de microscópio

óptico. As folhas do capim-tanzânia foram finalmente armazenadas em sacos de papel e levadas para secagem em estufa de ventilação forçada (55 ± 5 °C) por 72 horas para determinar a produção de massa seca (MS) por vaso. Os resultados foram expressos como número de larvas/g de MS.

Figura 16 - Recuperação de larvas a partir da parte aérea do capim-tanzânia.



A- Lavagem das folhas em solução-detergente. B- Migração das larvas recuperadas através de lenços de papel.

Fonte: Elaborada pela autora.

6.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos resultados obtidos a partir de testes *in vitro* e em casa de vegetação foram realizadas utilizando o programa Sisvar (FERREIRA, 2011). Os dados obtidos nos testes de eclosão de ovos e migração larval foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o teste de Tukey para comparação das médias e a relação entre as variáveis SPAD x T-Mo foi avaliada por análise de regressão linear. Níveis de significância de 5% ($P < 0,05$) foram estabelecidos. As concentrações efetivas (EC50 e EC90), determinadas para o ensaio de desenvolvimento larval por minicoproculturas, foram calculadas utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0 com intervalo de confiança de 95%

As variáveis analisadas no experimento *in vivo* foram submetidas aos testes de distribuição normal Shapiro-Wilk e Bartlett. Para a variável OPG, que não apresentou distribuição normal, os valores foram normalizados aplicando-se a transformação $OPG' = \sqrt{OPG + 1}$. Teste F foi aplicado através da Análise de Variância de Medidas Repetidas.

As variáveis FAMACHA e ECC foram avaliadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Tukey. Nível de significância de 5% foi considerado para todos os testes. O software estatístico utilizado para as análises foi o R Studio (R CORE TEAM, 2019).

7 RESULTADOS

7.1 PARTE I – Purificação e isolamento de peptídeos ativos

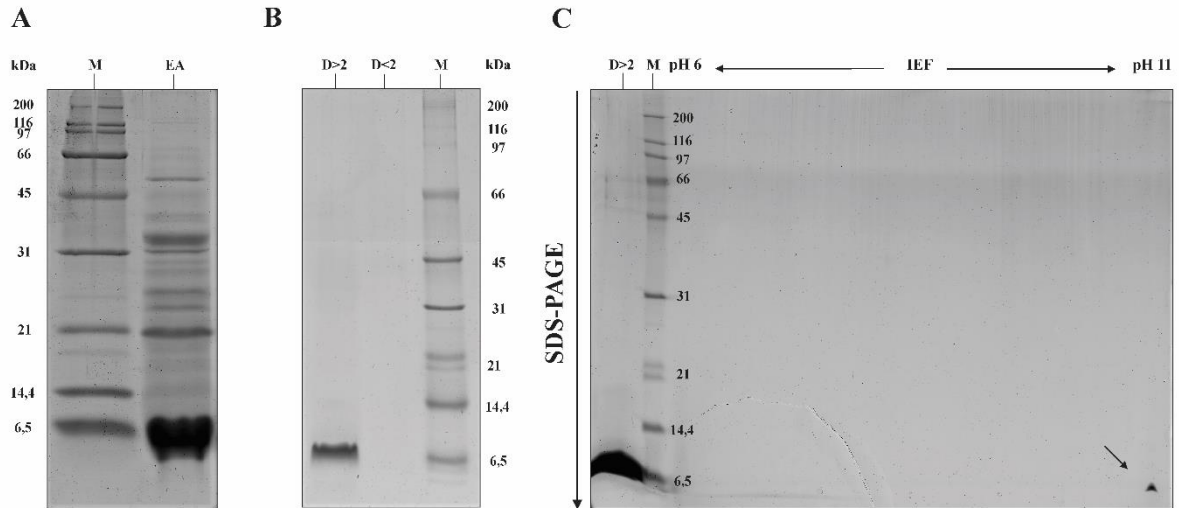
7.1.1 Extração e caracterização de frações proteicas das sementes de moringa

A concentração de proteínas solúveis no extrato aquoso (EA) e na fração $D > 2$ de *M. oleifera* foram, respectivamente, $3,988 \pm 0,005$ e $0,038 \pm 0,002$ mg/g de farinha. Nenhum conteúdo proteico foi detectado na fração $D < 2$.

Avaliações qualitativas do EA e das frações de baixa massa, $D > 2$ e $D < 2$, por eletroforeses estão apresentadas na **Figura 17**. Algumas bandas proteicas foram observadas para o EA na sua forma reduzida, cujas massas moleculares aparentes variaram entre ~6,5 e ~116 kDa (**Figura 17A**). Contudo, a banda correspondente a moléculas na região próxima a 6,5 kDa destacou-se entre as demais por apresentar maior intensidade, evidenciando a representatividade de proteínas de baixa massa no extrato obtido. O perfil eletroforético das frações $D > 2$ e $D < 2$ (**Figura 17B**) confirmou a ausência de compostos proteicos em $D < 2$ e mostrou a eficiência do processo de ultrafiltração para separação das moléculas proteicas de baixa massa presentes no EA, uma vez que apenas banda proteica próxima de 6,5 kDa foi observada no perfil da fração de interesse: $D > 2$. A análise da referida fração proteica por eletroforese bidimensional reafirmou o grau de purificação alcançado, revelado como um único spot que evidenciou um agrupamento peptídico com moléculas de massas aparentes menores que 6,5 kDa e fortemente catiônicas, característica esta demonstrada pelo alto valor de ponto isoelétrico (pI~10,6) observado (**Figura 17C**).

A atividade da fração $D > 2$ foi então avaliada através dos ensaios *in vitro* de microfloculação e através de teste de eclosão de ovos. Os resultados para ambos os testes, expressos em unidades percentuais, foi de 99% de atividade tanto para redução de turbidez quanto para atividade anti-helmíntica de inibição da eclosão, revelando um caráter multifuncional para a fração obtida (**Figura 18A e B**).

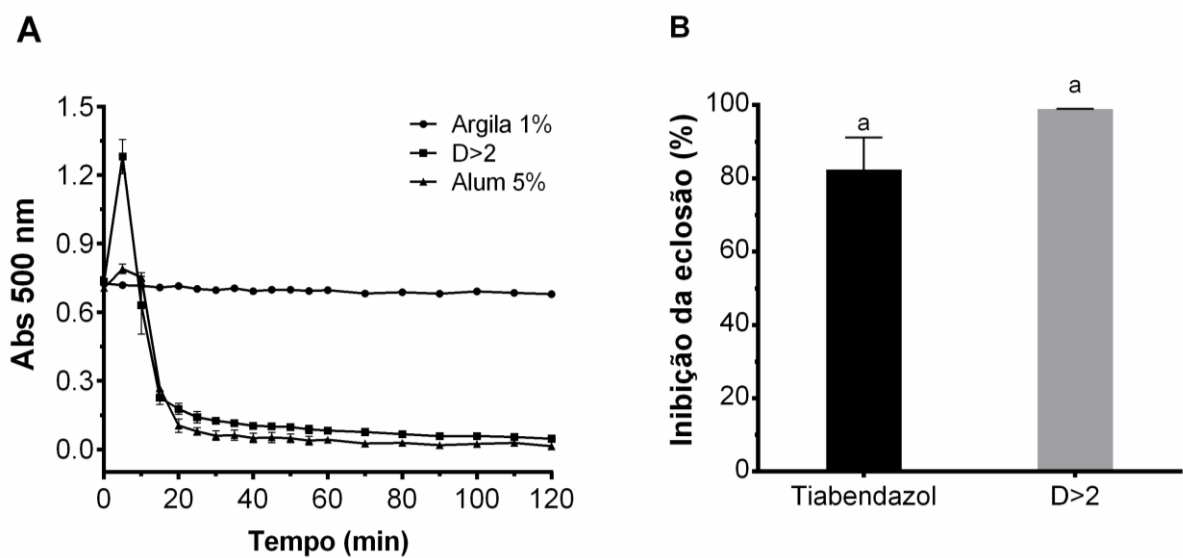
Figura 17 - Caracterização eletroforética de frações proteicas de sementes de *Moringa oleifera*.



A- SDS-PAGE do extrato aquoso (EA). B- Tricina SDS-PAGE das frações D > 2 e D < 2. C- Eletroforese bidimensional da fração D > 2. M: Marcador de massa molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 18 - Atividade floculante (A) e atividade inibitória da eclosão de ovos (B) da fração D > 2.



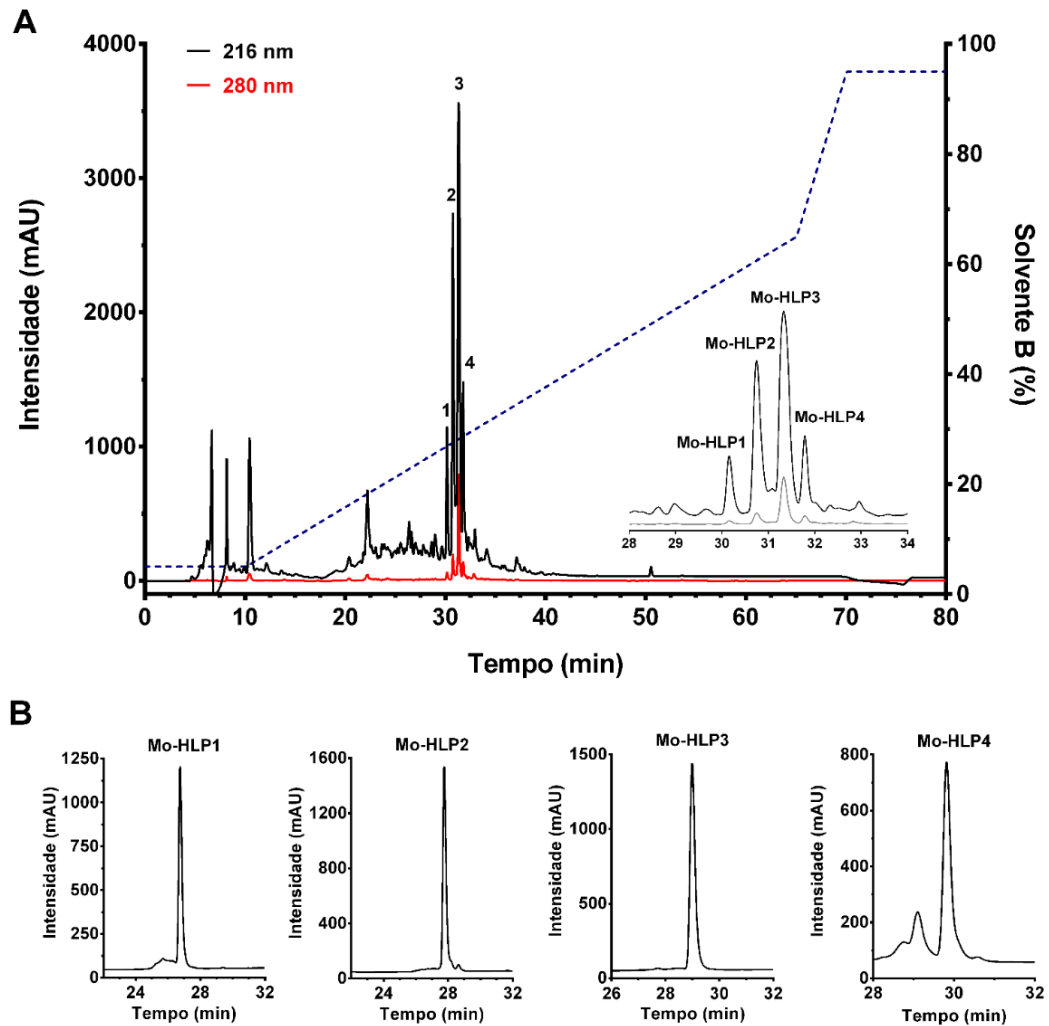
*Concentração final da fração D > 2 = 1 mg de massa/mL de solução (A); 0,2 mg de proteína/mL (B).

Fonte: Elaborada pela autora.

7.1.2 Isolamento e identificação de Mo-HLPs

A separação de $D > 2$ por RP-HPLC evidenciou o grau de heterogeneidade da fração obtida por diálise e revelou entre seus constituintes quatro frações cromatográficas intensas e eluídas consecutivamente entre os tempos de retenção de 30 e 32 minutos, designadas de Mo-HLP 1, 2, 3 e 4 (**Figura 19**). Breve análise da massa dos Mo-HLPs foi realizada utilizando sistema cromatográfico acoplado a espectrômetro de massa (LC-ESI-MS), onde íons correspondentes aos Mo-HLPs em diferentes estados de cargas foram observados e sendo possível a detecção dos seguintes valores de massa monoisotópica para as quatro respectivas frações: $[M + H]^+ = 4753$ Da; 4584 Da; 4812 Da e 4655 Da (**Figura 20**).

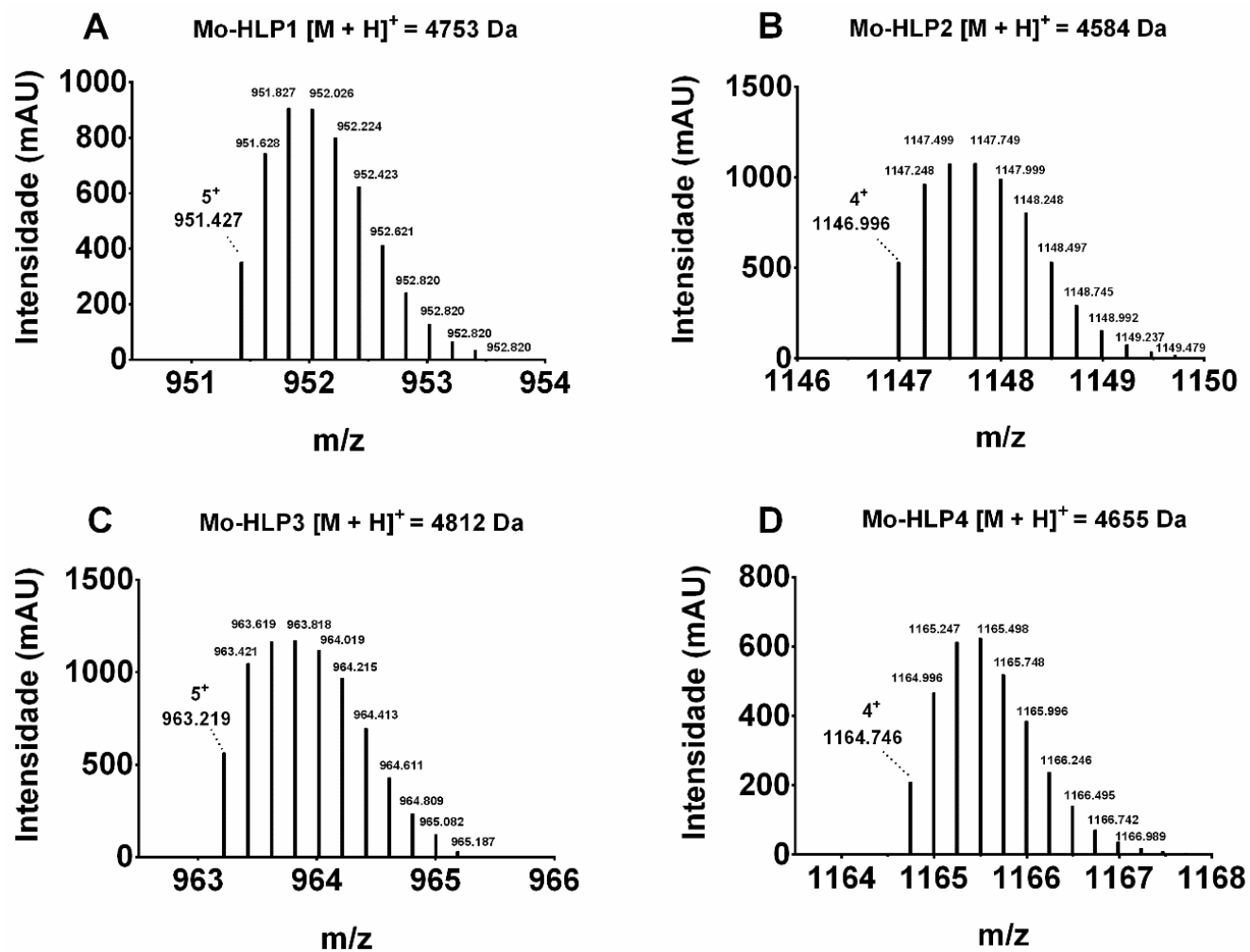
Figura 19 - Purificação de Mo-HLPs por RP-HPLC.



A- Cromatograma da fração $D > 2$. B- Cromatograma dos Mo-HLPs purificados.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 20 - Espectros de massa deconvoluídos dos Mo-HLPs obtidos em modo íon positivo e analisados entre faixas de massa de 200 e 2500 m/z.



Fonte: Elaborada pela autora.

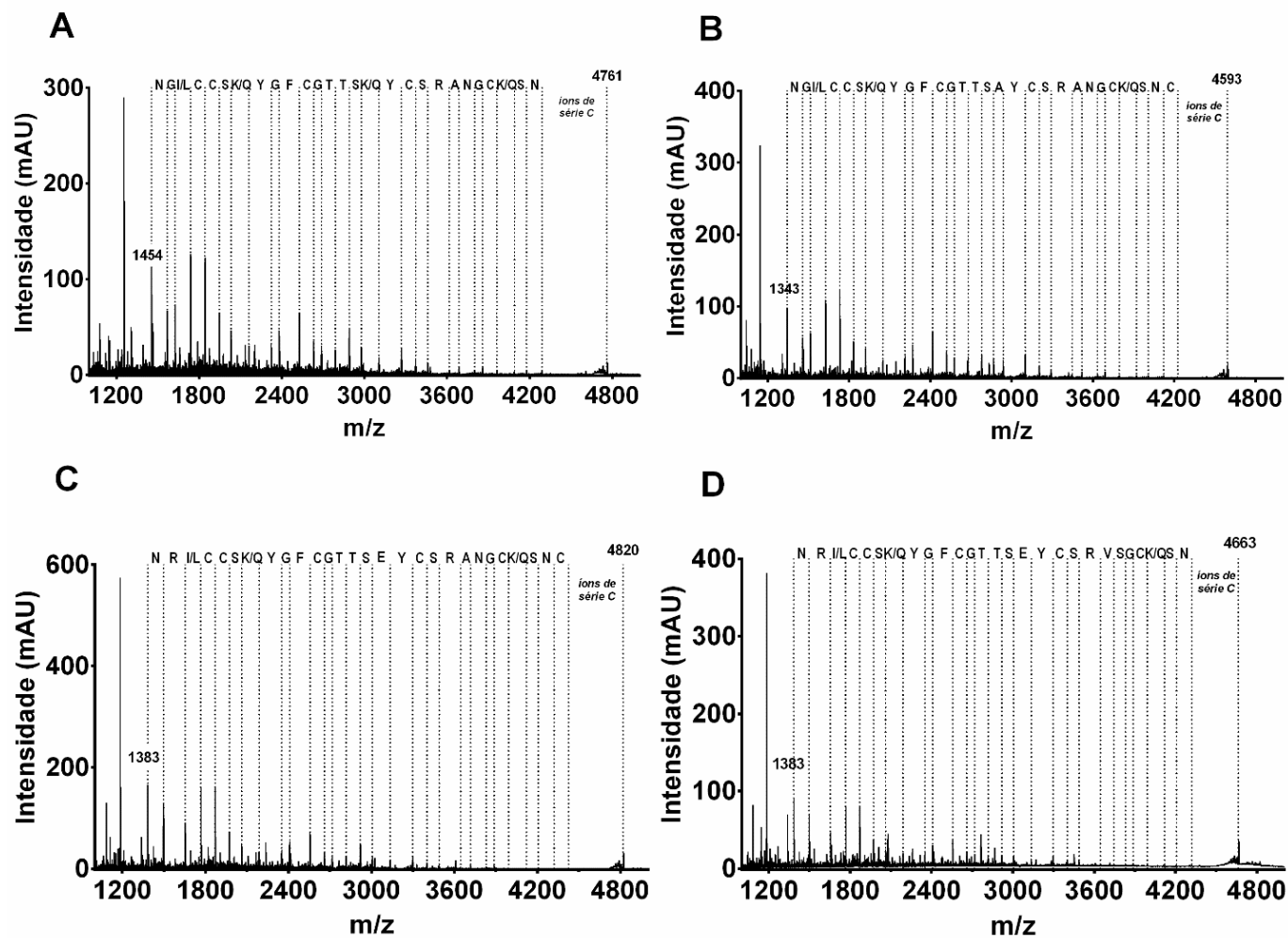
7.1.3 Determinação da estrutura primária dos Mo-HLPs

Abordagem do tipo *top-down* utilizando a técnica de MALDI com fragmentação direta na fonte (MALDI-MSD) foi inicialmente realizada para análise dos Mo-HLPs isolados por RP-HPLC a partir da fração D > 2 previamente tratada com DTT 200 mM (**Figura 21**). Nos espectros obtidos para os quatro peptídeos sob a forma reduzida foram observados a presença de íons precursores com diferença de cerca de 8 Da nos valores de m/z em relação às moléculas oxidadas, sugerindo a presença de quatro pontes dissulfeto. A interpretação manual do perfil de fragmentação possibilitou a determinação de alguns resíduos de aminoácidos constituintes desses Mo-HLPs, cujas sequências encontradas estão resumidas na **Tabela 3**. As poucas substituições entre os aminoácidos, observadas em posições bastante específicas, revelaram tratar-se de quatro isoformas peptídicas. Assim, considerando o rendimento do material, Mo-HLP3 foi selecionado para caracterizações posteriores por corresponder à fração cromatográfica majoritária.

7.1.4 Determinação do número de cisteínas

Análises comparativas entre espectros obtidos por MALDI-TOF-MS de Mo-HLP3 nas formas oxidada, reduzida e S-alquilada foram utilizadas para determinar o número de resíduos de cisteína. Mo-HLP3 na sua forma nativa mostrou-se como íon mono e duplamente carregado com massa média de $[M + H]^+ = 4817,3$ Da e $[M + 2H]^{2+} = 2407,9$ Da, respectivamente (**Figura 22A**). Após redução com DTT 200 mM Mo-HLP3 apresentou um aumento de massa equivalente a 8,1 Da, sugerindo a presença de oito resíduos de cisteína, o que foi comprovado após a análise da molécula no estado S-alquilado com iodoacetamida (IAA), onde uma massa média de $[M + H]^+ = 5280,3$ Da foi observada, revelando um deslocamento de +463 Da, correspondente a adição de cerca de 58 Da para cada um dos oito grupos tiois (**Figura 22B e C**).

Figura 21 - Espectros MALDI-MS dos Mo-HLP 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D) usando 1,5-diaminonaftaleno (1,5-DAN) como matriz.



Fonte: Elaborada pela autora.

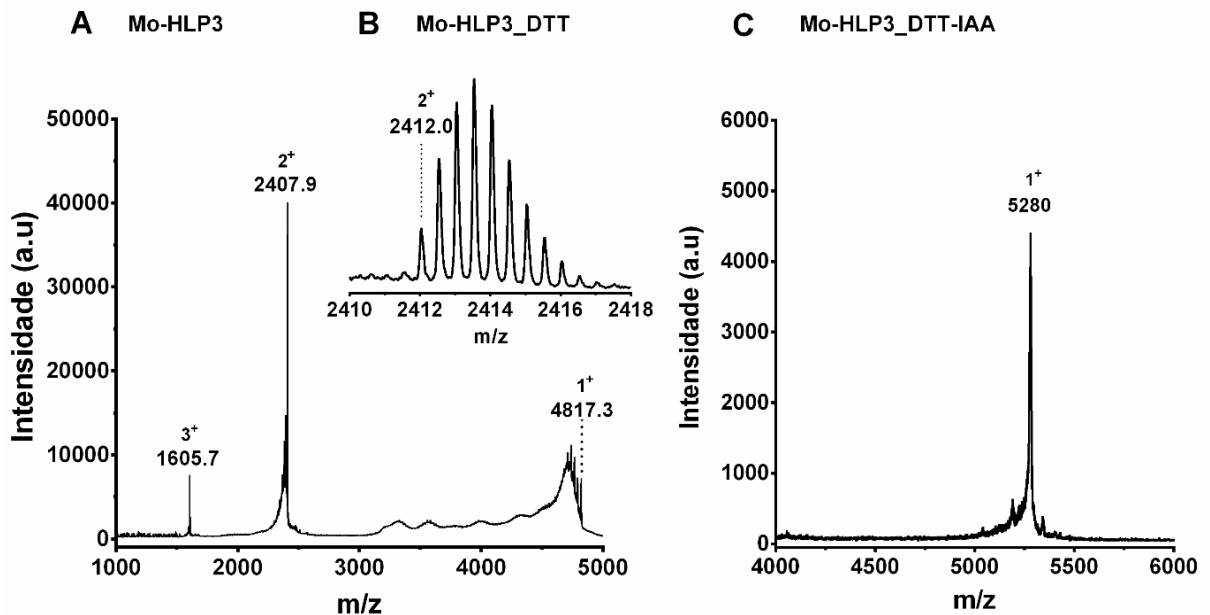
Tabela 3 - Sequências parciais de Mo-HLPs obtidas através da técnica de MALDI com fragmentação direta na fonte (MALDI-MSD).

| Peptídeo | Sequência |
|----------|---|
| Mo-HLP1 | ...NG(I/L)CCS(K/Q)YGF CGTTS(K/Q)YCSR ANGC(K/Q)SN... |
| Mo-HLP2 | ...NG(I/L)CCS(K/Q)YGF CGTTSAYCSR ANGC(K/Q)SNC... |
| Mo-HLP3 | ...NR(I/L)CCS(K/Q)YGF CGTTSEYCSR ANGC(K/Q)SNC... |
| Mo-HLP4 | ...NR(I/L)CCS(K/Q)YGF CGTTSEYCSR VSGC(K/Q)S... |

Os aminoácidos isobáricos (I/L e K/Q) aparecem alternativamente representados devido a limitações da técnica em distingui-los.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 22 - Perfil MALDI-TOF-MS de Mo-HLP3 em estado nativo (A), reduzido com DTT 200 mM (B) e S-alquilado com IAA 500 mM (C).



Fonte: Elaborada pela autora

Na tentativa da elucidação completa da sequência, Mo-HLP3 foi submetido a sequenciamento por espectrometria de massa em tandem (MALDI-MS/MS). Os fragmentos tripticos gerados por digestão da fração S-alquilada foram isolados por RP-HPLC e identificados por MALDI-TOF. Ao todo foi possível a identificação de 11 peptídeos tripticos (**Tabela 4**). A maioria dos peptídeos isolados derivaram de fragmentações internas de dois íons principais (1 e 8) de m/z 2235,5 Da; 1309 Da, reforçando a identidade das sequências obtidas para os referidos peptídeos. Já a identificação dos peptídeos 10 e 11 forneceu sequências distintas daquelas até então encontradas, porém, quando submetidas a alinhamentos contra banco de dados resultaram em baixos valores de score e altos valores de *expected-value* (e-value), afetando a confiabilidade de tais resultados e, portanto, não foram consideradas para comporem dados da sequência.

Tabela 4 - Sequências peptídicas obtidas por MALDI-MS/MS dos fragmentos tripticos gerados a partir da digestão de Mo-HLP3.

| Peptídeo triptico | Sequência | Massa encontrada [M+H] ⁺ | Massa calculada* [M+H] ⁺ |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | (I/L)CCS(K/Q)YGFCGTTSEYCSR-OH | 2235,5 Da | 2235,8562 Da |
| 2 | CCS(K/Q)YGFCGTTSEYCSR-OH | 2123,0 Da | 2122,7721 Da |
| 3 | CS(K/Q)YGFCGTTSEYCSR-OH | 1962,4 Da | 1962,7415 Da |
| 4 | (K/Q)YGFCGTTSEYCSR-OH | 1715,8 Da | 1715,6788 Da |
| 5 | YGFCGTTSEYCSR-OH | 1587,6 Da | 1587,6202 Da |
| 6 | CGTTSEYCSR-OH | 1220,4 Da | 1220,4670 Da |
| 7 | TSEYCSR-OH | 902,4 Da | 902,3672 Da |
| 8 | ANGC(K/Q)SNCWGR-OH | 1309,0 Da | 1309,5160 Da |
| 9 | GC(K/Q)SNCWGR-OH | 1124,1 Da | 1124,4360 Da |
| 10 | ADGCTI/LDGPTGR-OH | 1219,4 Da | 1219,5371 Da |
| 11 | VATVSPI/LR-OH | 842,5 Da | 842,5094 Da |

* Valores calculados utilizando o programa ExPASy.

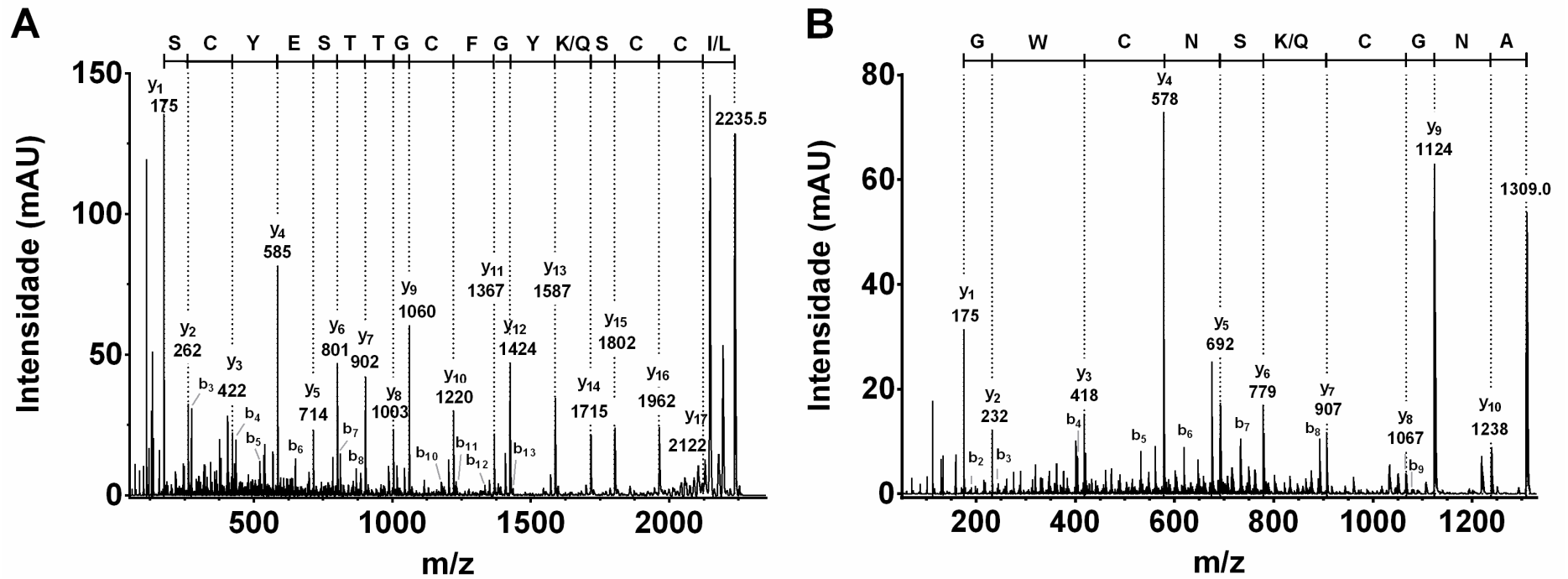
Fonte: Elaborada pela autora.

O sequenciamento de novo dos íons m/z 2235,5 e 1309 Da, cujos espectros estão apresentados na **Figura 23**, permitiu a obtenção de uma sequência parcial consistindo de 29 resíduos de aminoácidos, sendo a ordem definida a partir do perfil de fragmentação do Mo-HLP3 intacto. Assim, com base nos perfis MALDI-MS/MS e MALDI-TOF-MS/MS foi possível a obtenção da seguinte sequência de 31 resíduos de aa para Mo-HLP3: ...NRLCCSQYGFCGTTSEYCSRANGCQSNWGR-OH, depositada na base de dados UniProtKB/Swiss-Prot (código de acesso: C0HLN3). A distinção entre os resíduos isobáricos

Ile/Leu (I/L) ou Lys/Gln (K/Q) foi fundamentada a partir de similaridades com outras sequências disponíveis em bancos de dados.

A análise de BLAST mostrou que Mo-HLP3 compartilha alta identidade (90%) e similaridade (93-96%) de sequência com morintides mO1 e mO2 encontrados em folhas de moringa e pertencentes à família de peptídeos hevein-like (HLP). O alinhamento da sequência de Mo-HLP3 com outros peptídeos 8C-hevein-like demonstrou um alto grau de conservação de resíduos entre representantes dessa família, incluindo os resíduos de cisteína, que em morintides parecem obedecer a um padrão específico de espaçamento ($X2C^I-X8C^{II}-X4C^{III}C^{IV}-X5C^V-X6C^{VI}-X5C^{VII}-X3C^{VIII}-X3$ onde: X=qualquer aa), assim como a presença de um domínio ligante à quitina, também chamado domínio hevein, perfeitamente conservado ($SX\Phi X\Phi CGX4\Phi$ onde: X=qualquer aa; Φ = Trp, Tyr ou Phe) (Kini et al., 2017), caracterizando os Mo-HLPs, aqui encontrados, como típicos integrantes do grupo (**Tabela 5**).

Figura 23 - Espectros de fragmentação MALDI-TOF-MS/MS dos íons m/z 2235,5 $[M + H]^+$ (A) e m/z 1309 $[M + H]^+$ (B) obtidos após digestão de Mo-HLP3 por tripsina.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 5 - Alinhamento da sequência parcial de Mo-HLP3 com domínios maduros de outros peptídeos 8C-hevein-like.

| Organismo | Peptídeo | Sequência | | | | | | Referência | |
|---------------------------|----------------|------------------|-----------|--------------|----------------|----------------|---------------|---------------------|----------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | |
| <i>Moringa oleifera</i> | Mo-HLP3 | ----- | NRL | <u>CC</u> | <u>SQYGF</u> | <u>CGTTSEY</u> | <u>C</u> | SRANGCQSNCWGR | Este estudo |
| <i>Moringa oleifera</i> | mO1 | QNCGRQAGNRACANQL | <u>CC</u> | <u>SQYGF</u> | <u>CGSTSEY</u> | <u>C</u> | SRANGCQSNCRGG | (KINI et al., 2017) | |
| <i>Moringa oleifera</i> | mO2 | QNCGRQAGNRACANGL | <u>CC</u> | <u>SQYGF</u> | <u>CGSTSEY</u> | <u>C</u> | SRANGCQSNCRGG | (KINI et al., 2017) | |
| <i>Hevea brasiliensis</i> | Hevein | EQCGRQAGGKLC | PNNL | <u>CC</u> | <u>SQWGW</u> | <u>CGSTDEY</u> | <u>C</u> | SPDHNCQSNCKD- | (ARCHER, 1960) |
| Pharbitis nil | Pn-AMP1 | QQCGRQASGRLC | GNRL | <u>CC</u> | <u>SQWGY</u> | <u>CGSTASY</u> | <u>C</u> | GAG--CQSQCRS- | (KOO et al., 1998) |
| Pharbitis nil | Pn-AMP2 | QQCGRQASGRLC | GNRL | <u>CC</u> | <u>SQWGY</u> | <u>CGSTASY</u> | <u>C</u> | GAG--CQSQCR-- | (KOO et al., 1998) |
| <i>Vaccaria hispanica</i> | vH1 | FQCGRQAGGARCS | SNGL | <u>CC</u> | <u>SQFGY</u> | <u>CGSTPPY</u> | <u>C</u> | GAGQ-CQSQCA-- | (WONG et al., 2017a) |
| <i>Vaccaria hispanica</i> | vH2 | FQCGRQAGGARCS | SNGL | <u>CC</u> | <u>SQFGY</u> | <u>CGSTPPY</u> | <u>C</u> | GAGQ-CQSQC--- | (WONG et al., 2017a) |

Todos os peptídeos apresentam um domínio de ligação à quitina correspondente aos resíduos sublinhados. O padrão Cys está destacado em cinza.

Fonte: Elaborada pela autora.

7.1.5 Estrutura tridimensional de Mo-HLPs

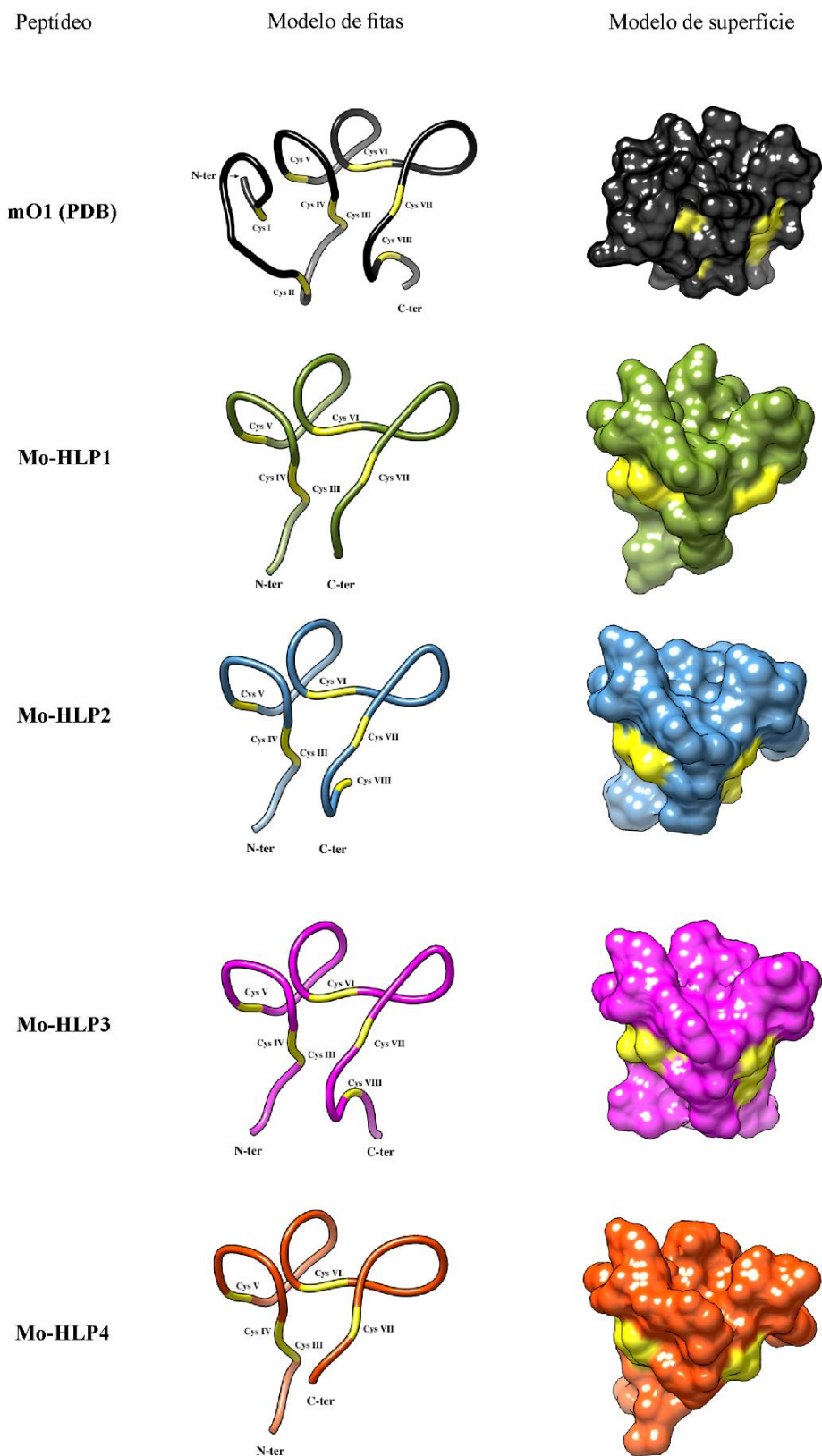
Na etapa de busca por sequências-modelo relacionadas aos alvos de estudo (Mo-HLPs) foram encontrados alguns peptídeos com alta identidade comparada às estruturas primárias de Mo-HLPs. Dentre esses destacaram-se isoformas de Hevein (PDB: 1WKX; 1Q9B) e proteína quitinase-like (PDB: 4MPI) encontradas em *Hevea brasiliensis* que mostraram entre 60-70% de identidade com as diferentes isoformas de Mo-HLPs, além da isoforma mO1 de Morintides (PDB: 5WUZ) encontrada em *Moringa oleifera*, cuja identidade com Mo-HLPs variou entre 85-90%. Tais moléculas destacadas tiveram seus modelos tridimensionais determinados e validados por difração de raio-X ou por ressonância magnética nuclear (mO1).

Considerando o elevado grau de identidade, a estrutura de mO1 foi selecionada como molde para construção dos modelos tridimensionais de Mo-HLPs, cujos resultados finais para cada molécula são mostrados na **Figura 24**. Os modelos 3D obtidos para Mo-HLPs revelaram que suas conformações espaciais são constituídas por estruturas intrinsecamente desordenadas, “randon coil”, estando ausente estruturas secundárias do tipo α -hélice e folhas β . O arranjo semelhante ao de morintides sugere que Mo-HLPs são fortemente estabilizadas pelas pontes dissulfeto formadas entre os resíduos de Cys.

A sobreposição de Mo-HLP3 com mO1 (**Figura 25A**) além de confirmar o alto grau de similaridade estrutural entre as moléculas, evidenciou a porção da região N-terminal não identificada em Mo-HLPs, onde é possível verificar a presença das Cys I e II do total de oito Cys (destacadas em amarelo).

A partir da sobreposição das estruturas dos diferentes Mo-HLPs também pode-se observar pequenas alterações estruturais acarretadas pelas substituições entre os resíduos de cada isoforma, que eventualmente podem interferir em suas características funcionais (**Figura 25B**). A região formada pelo domínio de ligação à quitina, característica de HLPs, foi destacada em azul na estrutura de Mo-HLPs como apresentada na **Figura 25C**. Em azul escuro pode-se visualizar o padrão de resíduos altamente conservados do domínio hevein: uma serina (S) e dois resíduos aromáticos, tirosina (Y) e fenilalanina (F) para Mo-HLPs, no loop 3; além de uma glicina (G) e uma tirosina (Y) no loop 4.

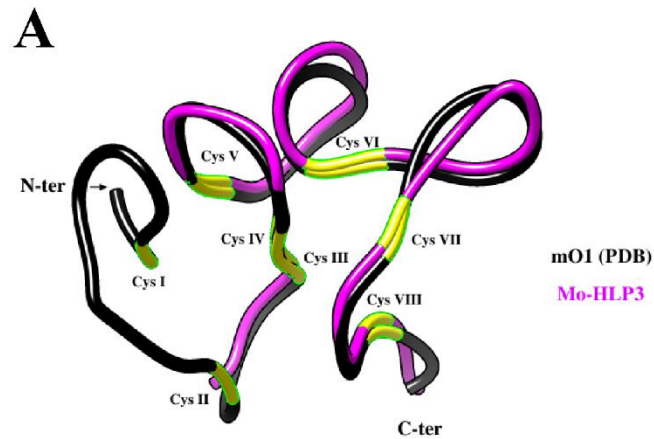
Figura 24 - Estruturas 3D de mO1 e Mo-HLPs de *Moringa oleifera*.



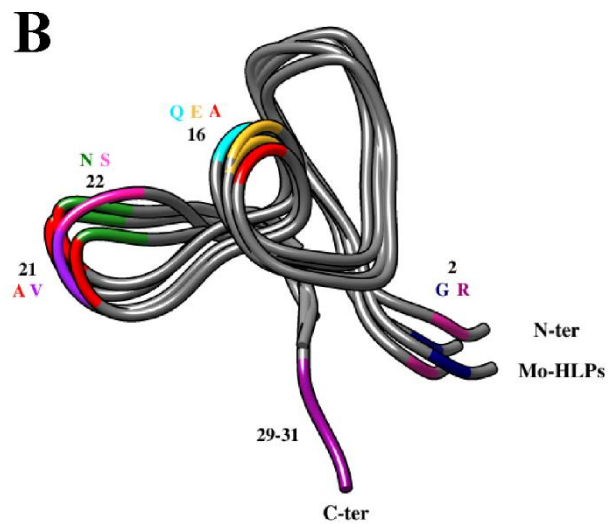
*Resíduos de cisteínas (Cys) foram destacados em amarelo.

Fonte: Elaborada pela autora.

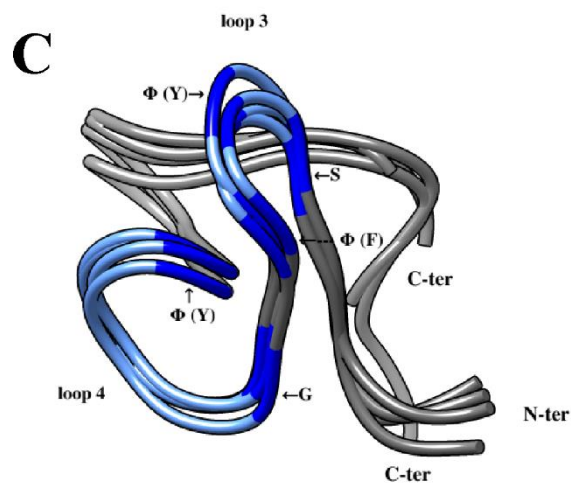
Figura 25 - Comparações estruturais entre mO1 e Mo-HLP3 (A) e entre Mo-HLPs (B e C).



^ADestaque para região N-terminal das moléculas.



^BDestaque para as substituições entre os aminoácidos das diferente isoformas.



^CDestaque para o domínio de ligação à quitina marcado em azul. *As estruturas foram rotacionadas.

7.1.6 Testes de atividades com Mo-HLPs

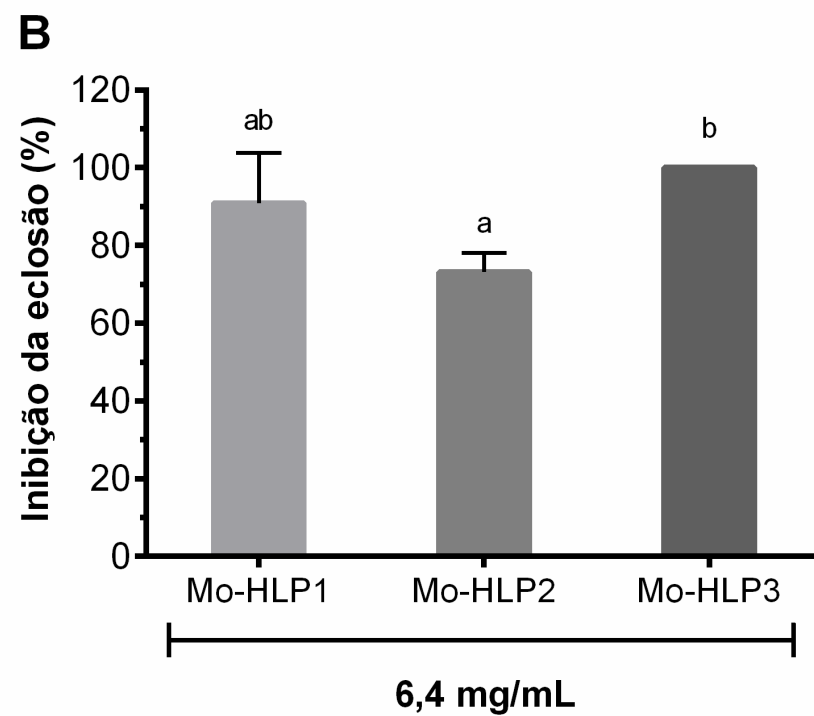
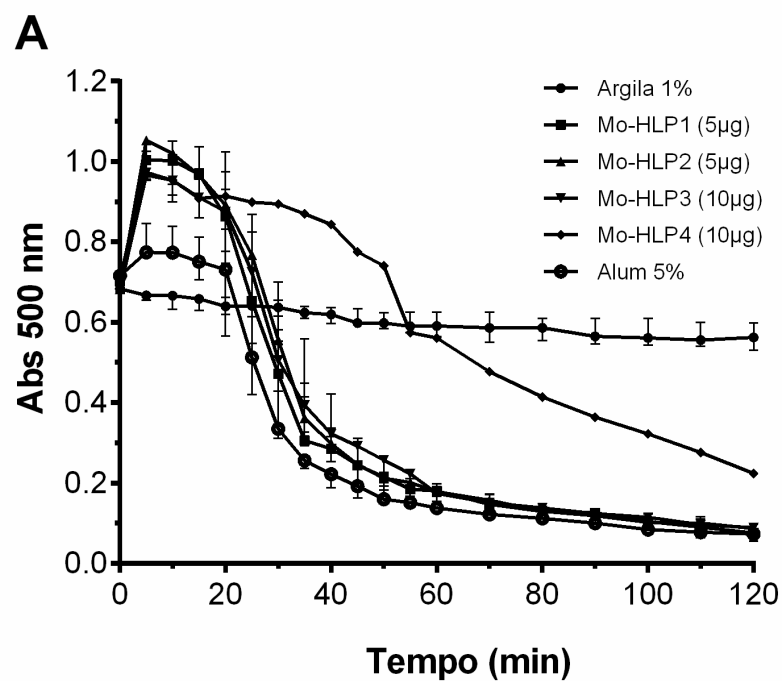
7.1.6.1 *Atividade floculante*

A avaliação dos diferentes Mo-HLPs através de testes de microfloculação comprovou a participação desses peptídeos como importantes agentes envolvidos nos processos de coagulação/floculação exibidos por sementes de moringa (**Figura 26A**). A redução dos níveis de OD₅₀₀ promovida por todas as isoformas peptídicas sugere um efeito conjunto dessas moléculas na atividade floculante previamente detectada para a fração de origem, D > 2. Dentre os quatro peptídeos identificados, Mo-HLP1 e Mo-HLP2 exibiram maior eficiência de coagulação/floculação, uma vez que foram requeridos em menores concentrações (5 µg/mL de solução) para reduzirem a turbidez inicial da solução de argila em cerca de 89%, efeito igualmente desempenhado pelo sulfato de alumínio que promoveu 90% de redução. No entanto, foi necessário o dobro da concentração (10 µg/mL de solução) para que os efeitos floculantes de Mo-HLP3 e Mo-HLP4 fossem observados. Esses últimos promoveram reduções nos níveis de OD₅₀₀ de 89 e 67%, respectivamente.

7.1.6.2 *Atividade ovicida*

Os Mo-HLPs identificados também apresentaram excelentes efeitos anti-helmínticos quando avaliados quanto à capacidade de inibir a eclosão de ovos de nematoides GI (**Figura 26B**). Assim como observado nos testes de microfloculação, os Mo-HLPs mostraram eficiências distintas entre as isoformas ($P < 0,05$) e reforçaram a hipótese de uma participação sinérgica das moléculas com relação aos efeitos previamente detectados para a fração D > 2. Os melhores desempenhos no teste de eclosão foram observados para Mo-HLP3, Mo-HLP1 e Mo-HLP2, nesta ordem, com efeitos inibitórios de 100%, 91% e 73% quando utilizados na concentração de 6,4 mg/mL. A atividade de Mo-HLP4 não pode ser avaliada através do teste anti-helmíntico em virtude do baixo rendimento na recuperação dessa isoforma durante a etapa de purificação cromatográfica.

Figura 26 - Atividade flocculante (A) e atividade inibitória da eclosão de ovos (B) de Mo-HLPs isolados das sementes de *M. oleifera*.



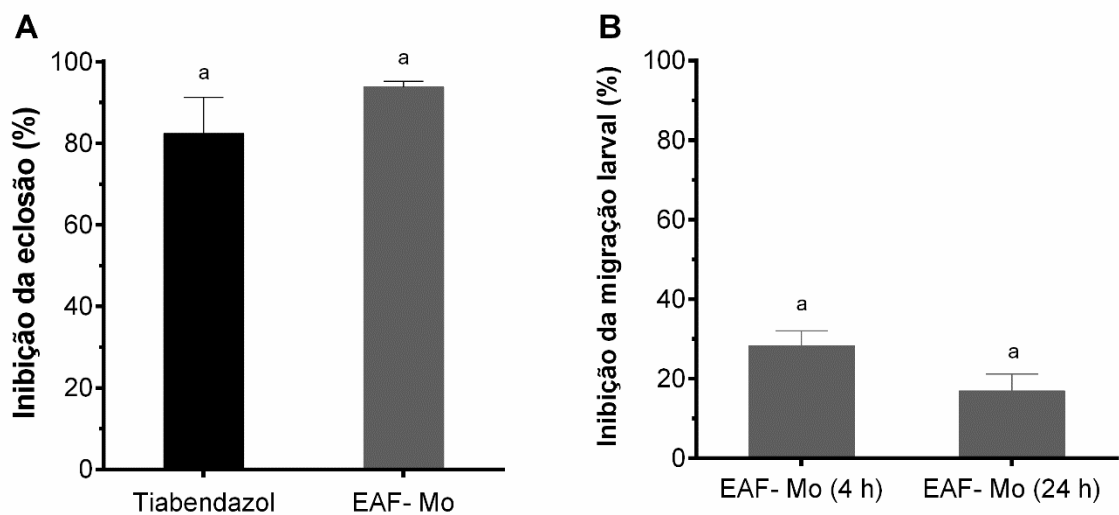
Fonte: Elaborada pela autora.

7.2 PARTE II – Utilização de moringa no controle de nematoides GI

7.2.1 Avaliação *in vitro* do material vegetal usado como fitoterápico

O EAF-Mo produzido a partir do F-Mo apresentou um rendimento aproximado de 26% (26 g de EAF-Mo/100 g de F-Mo) e foi utilizado para verificar o potencial ativo de ambos materiais através de testes *in vitro*. Os efeitos do EAF-Mo sobre diferentes estágios de vida livre de nematoides GI estão apresentados na **Figura 27**. Quando submetido ao teste de eclosão de ovos, EAF-Mo (100 mg/mL) apresentou excelentes efeitos ovicidas com inibição de 94% da taxa de eclosão, não diferindo ($P > 0,05$) do Tiabendazol (82% inibição) usado como controle positivo (**Figura 27A**). Por outro lado, o contato do EAF-Mo (50 mg/mL) com larvas infectantes (L3) interferiu fracamente na migração do referido estágio larval, uma vez que as eficiências de inibição da migração nos tempos de 4 e 24 horas foram de apenas 28% e 17%, respectivamente. (**Figura 27B**).

Figura 27 - Avaliação dos efeitos anti-helmínticos *in vitro* do EAF-Mo.



(A) Teste de eclosão de ovos: EAF-Mo =100 mg/mL (B) Teste de inibição da migração larval: EAF-Mo =50 mg/mL.

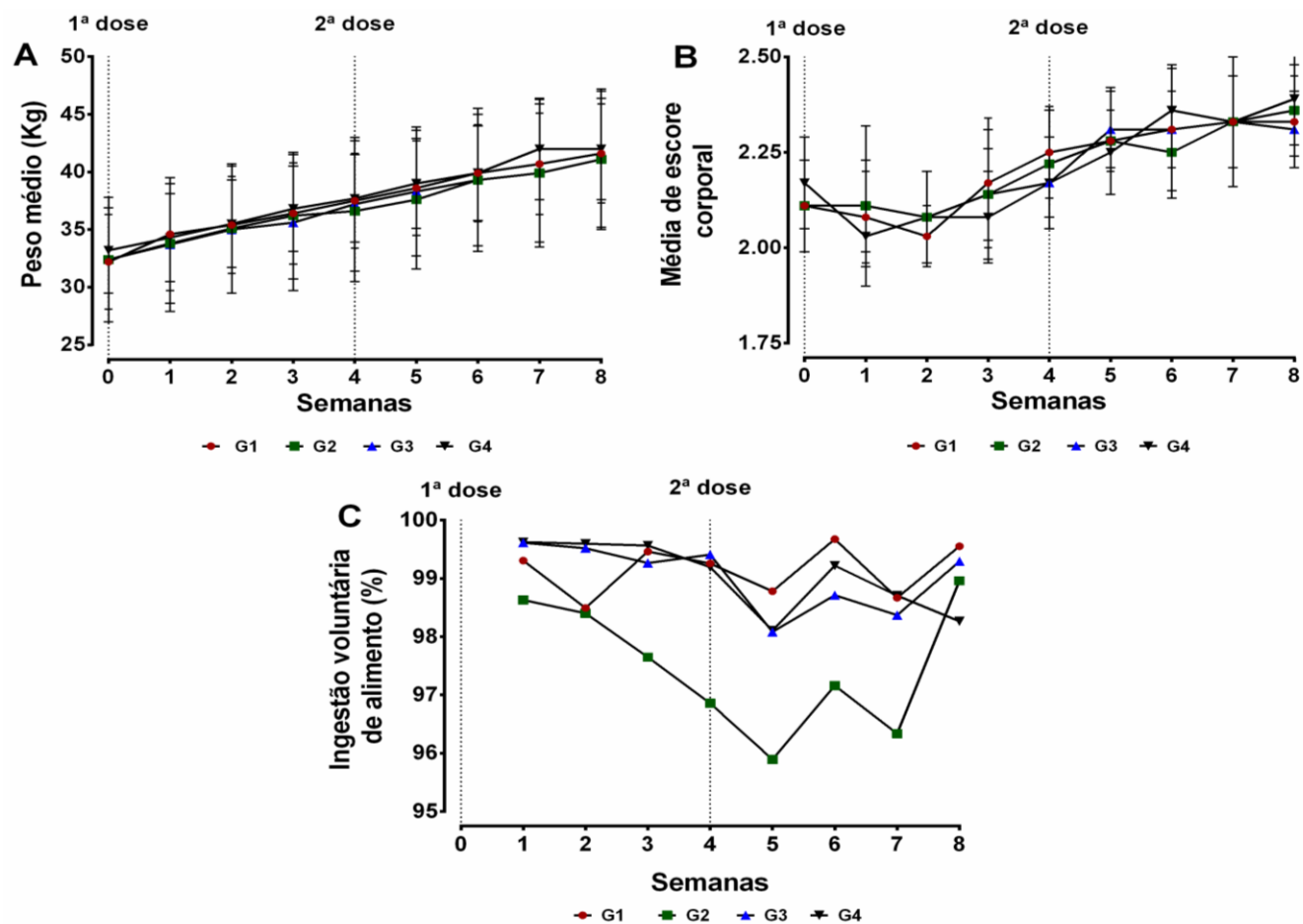
Fonte: Elaborada pela autora.

7.2.2 Atividade anti-helmíntica *in vivo*

7.2.2.1 Ganho de peso, escore de condição corporal e ingestão de alimento

O fornecimento de uma dieta nutricional com elevados níveis de concentrado resultou em alto desempenho para os animais dos diferentes grupos experimentais. As infecções estabelecidas não influenciaram no ganho de peso vivo ou ingestão voluntária de alimento ($P > 0,05$), havendo um aumento gradativo e constante de peso durante todo o período de estudo com médias de escore de condição corporal entre 2,25 – 2,5 para todos os grupos (**Figura 28**). Ganhos de peso total de cerca de 9 Kg foram registrados tanto para os grupos tratados quanto para o grupo não tratado ($P > 0,05$). G1, tratado com oxafendazol, apresentou a maior média de ganho de peso diário (157 g/dia/animal) seguido por G4 (147 g/dia/animal), não tratado. Os grupos G2 e G3 que receberam os tratamentos à base moringa apresentaram um ganho diário médio de 144 e 146 g/animal, respectivamente (**Tabela 6**). Embora não diferindo significativamente, os menores valores de ganho de peso observados para os cordeiros do G2 podem ser atribuídos a menor ingestão de alimento detectada para o grupo (**Figura 28C**).

Figura 28 - Ganho de peso (A), Escore corporal (B) e Ingestão voluntária de alimento (C) de cordeiros infectados com nematoides GI, tratados e não tratados com *Moringa oleifera*.



G1- Grupo tratado com Oxafendazol; G2- Grupo tratado com T-Mo; G3- Grupo tratado com EAF-Mo e G4- Grupo infectado não tratado.
 Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 6 - Média do ganho de peso dos grupos experimentais alimentados com dieta de alto concentrado (DAC) durante 60 dias.

| Grupos | Peso inicial (Kg)* | Peso final (Kg) | Ganho total (kg) | Ganho (g/dia) |
|--------|--------------------|-----------------|------------------|---------------|
| G1 | 32,20 ± 4,1 | 41,62 ± 4,3 | 9,42 a | 157 a |
| G2 | 32,41 ± 5,4 | 41,06 ± 6,1 | 8,65 a | 144 a |
| G3 | 32,36 ± 5,4 | 41,09 ± 5,9 | 8,73 a | 146 a |
| G4 | 33,18 ± 3,7 | 42,00 ± 4,4 | 8,82 a | 147 a |

G1- Grupo tratado com Oxafendazol; G2- Grupo tratado com F-Mo; G3- Grupo tratado com EAF-Mo e G4- Grupo infectado não tratado.

*Peso no início da fase experimental, pós adaptação da dieta.

Letras iguais na mesma coluna não diferiram significativamente.

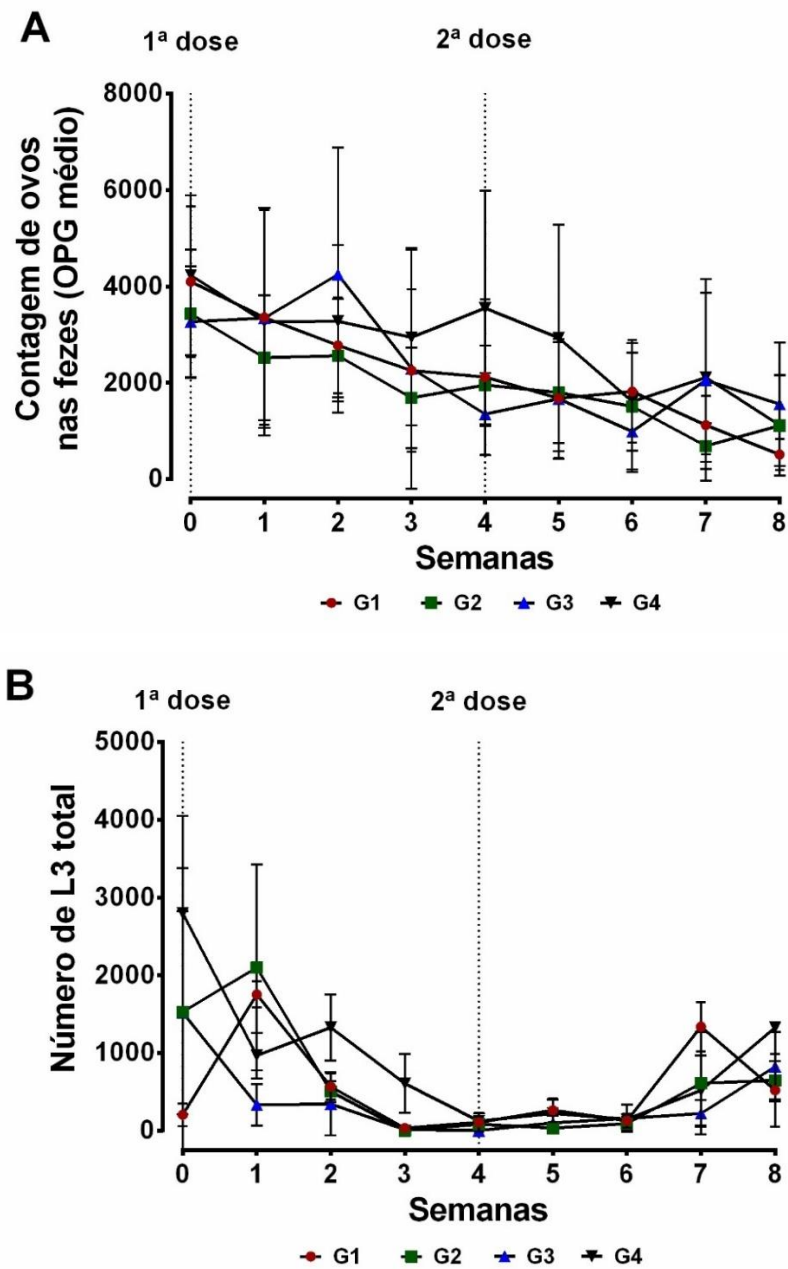
Fonte: Elaborada pela autora.

7.2.2.2 Contagem de ovos nas fezes e taxa de recuperação de L3

Análises das fezes coletadas de todos os animais antes do início dos tratamentos confirmaram o estabelecimento das infecções que foram evidenciadas por valores de OPG entre 3.200 e 4.200 (**Figura 29A**). Dentre as espécies de parasitos identificadas foi detectada prevalência de $91 \pm 0,03\%$ de *Haemonchus contortus*, além de terem sido encontrados $5 \pm 0,01\%$ de *Oesophagostomum columbianum* e $4 \pm 0,03\%$ de *Trichostrongylus colubriformis*. De maneira geral, a contagem do número de ovos nas fezes diminuiu ao longo das oito semanas de estudo (**Figura 29A**) não havendo diferença estatística entre grupos tratados e não tratado ($P > 0,05$). No entanto, quando considerado o período de avaliação em dois momentos (meio e fim) foi possível observar uma redução acentuada no número de OPG dos grupos tratados durante as quatro semanas iniciais após administração da primeira dose dos tratamentos. G3, que recebeu EAF-Mo, apresentou 58,7% de redução de OPG, seguido por G1 e G2 que reduziram 48,2% e 43%, respectivamente, valores bem superiores ao registrado para o controle negativo G4, que promoveu redução de apenas 16,1%. Já as reduções nos números de OPG observados nas quatro últimas semanas, após a segunda dosagem experimental, que culminaram em percentuais de aproximadamente 88, 68, 52 e 74% de diminuição do OPG para G1, G2, G3 e G4, nessa ordem, especulou-se que poderiam estar relacionadas à morte espontânea dos parasitos, uma vez que os cordeiros não foram submetidos a condições de reinfecção. Os resultados de OPG foram coerentes com os achados referentes às contagens do número de L3 obtidas a partir de posterior incubação das fezes contendo os ovos (**Figura 29B**). Porém, quedas

bruscas na recuperação de L3 até quarta semana foram observadas inclusive para o grupo não tratado, G4, de modo que limitações da técnica devem ser consideradas.

Figura 29 - Número médio de ovos por grama de fezes - OPG (A) e Número de L3 total obtidas através de minicoproculturas (B) de cordeiros infectados com nematoides GI, tratados e não tratados com *Moringa oleifera*.



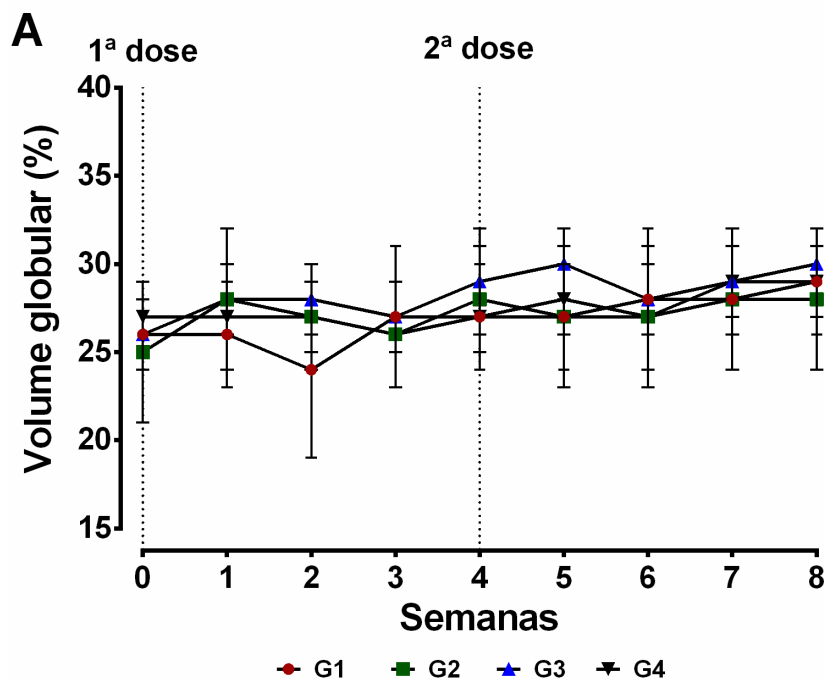
G1- Grupo tratado com Oxafendazol; G2- Grupo tratado com F-Mo; G3- Grupo tratado com EAF-Mo e G4- Grupo infectado não tratado.

Fonte: Elaborada pela autora.

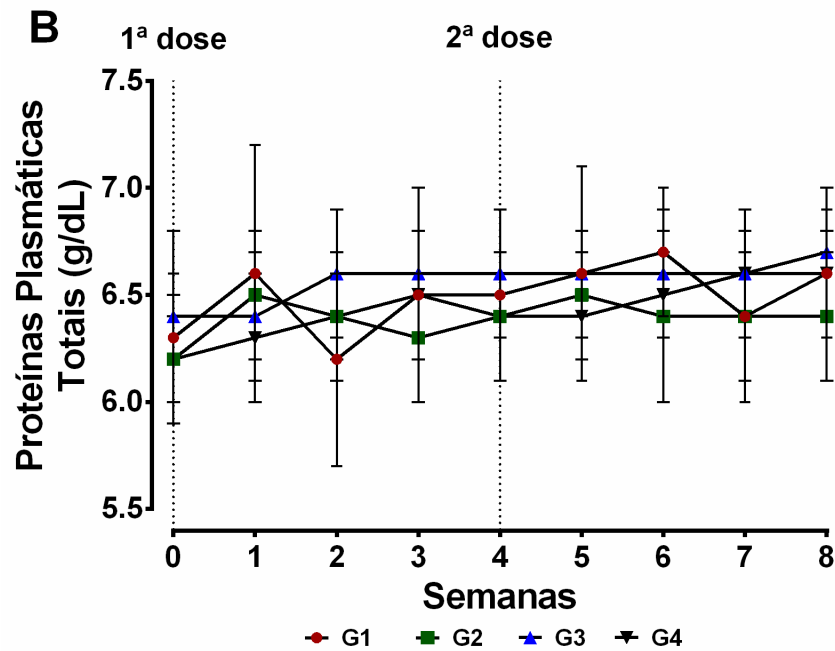
7.2.2.3 FAMACHA[®], volume globular (VG) e proteínas plasmáticas totais (PPT)

Através da avaliação clínica dos animais quanto ao surgimento de quadros de anemia, decorrentes da infecção, foi observado que todos os cordeiros se mantiveram fisicamente saudáveis ao longo do estudo, não apresentando quaisquer sinais de fraqueza, fadiga, palidez de mucosa ou inapetência. Observações da mucosa ocular mostraram escores de grau FAMACHA[®] variando entre 1 e 2 no decorrer das semanas, com exceção apenas para o grupo G4, onde foram registrados escores de grau 3, pontuais e não recorrentes, para alguns animais em semanas distintas. Evidências laboratoriais obtidas por meio de análise hematológica confirmaram a ausência de anemia com valores médios de VG e PPT similares entre os grupos tratados e não tratado ($P > 0,05$), com oscilações dentro da normalidade durante todo período avaliado (**Figura 30**).

Figura 30 - Valores de volume globular-VG (A) e Proteínas plasmáticas totais-PPT (B) de cordeiros infectados com nematoide GI, tratados e não tratados com *Moringa oleifera*.



Valores de referências: VG = 27-45% (BYERS; KRAMER, 2010).



Valores de referências: PPT = 6,0-7,5 g/dL (BYERS; KRAMER, 2010).

G1- Grupo tratado com Oxafendazol; G2- Grupo tratado com F-Mo; G3- Grupo tratado com EAF-Mo e G4- Grupo infectado não tratado.

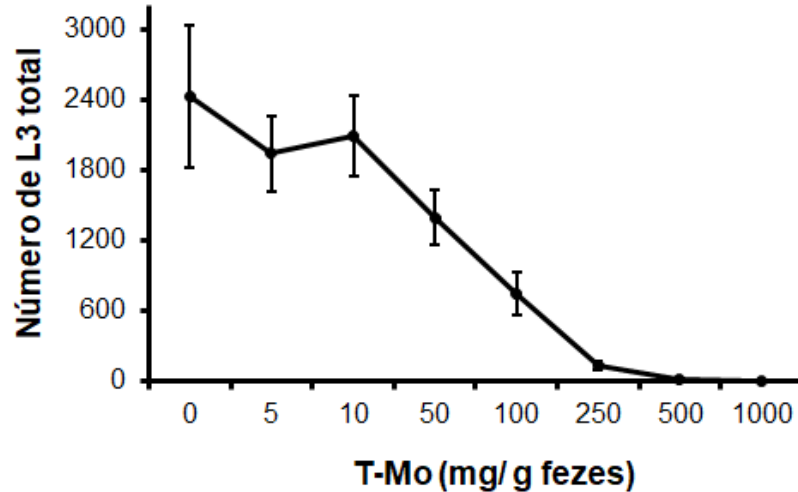
Fonte: Elaborada pela autora.

7.2.3 Efeito da T-Mo sobre o desenvolvimento das fases de vida livre de nematoides GI

7.2.3.1 Curva dose-resposta para atividade nematicida em minicoculturas

Resultados prévios de testes em minicoculturas revelaram uma tendência na redução do número de L3 de nematoides GI liberadas das fezes em resposta a dosagens crescentes de T-Mo (**Figura 31**). As concentrações efetivas CE50 e CE90 foram, respectivamente, 75,8 e 224,8 mg/g fezes. Assim, a avaliação do potencial de uso da T-Mo para descontaminação de forragem, cultivada em vasos, foi realizada considerando as relações fezes:T-Mo mais eficientes obtidas: 1000, 500 e 250 mg/g fezes, que foram equivalentes a (1:1), (1:1/2) e (1:1/4), além da relação (1:0) usada como testemunha.

Figura 31 - Curva dose-resposta obtida através de minicoproculturas para atividade nematicida da T-Mo.



Fonte: Elaborada pela autora.

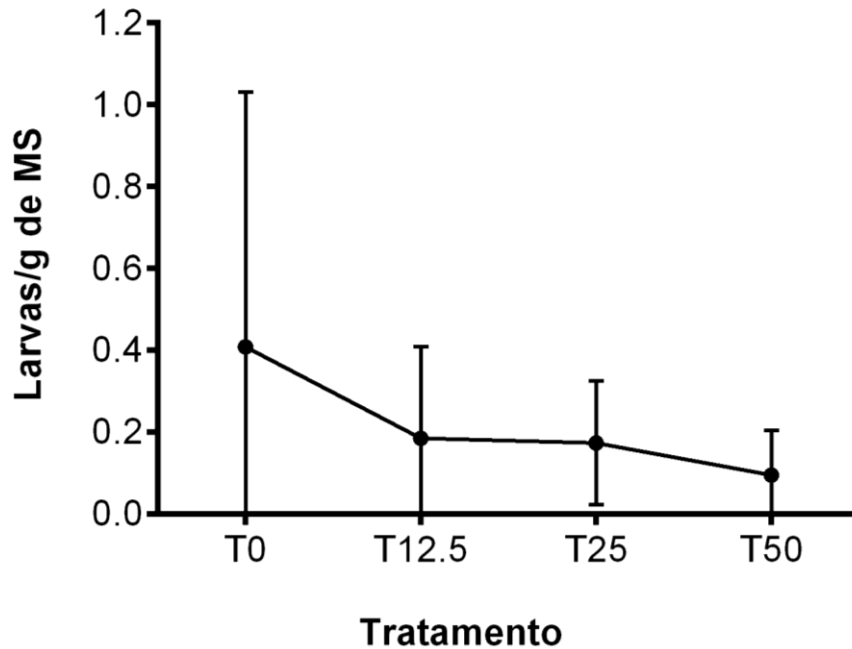
7.2.4 Efeitos da T-Mo sobre o solo de forragem cultivada em vasos

7.2.4.1 Recuperação e quantificação de larvas em capim-tanzânia

De maneira geral, foi observada uma contagem baixa quanto à totalidade de larvas recuperadas por planta, além de alta heterogeneidade (coeficiente de variação >100%) entre os valores das repetições de cada tratamento (**Figura 32**). Em média, o número total de larvas recuperadas em T0 foi 2 vezes superior aos registrados para T12.5 e T25, e 3 vezes superior à quantidade de larvas encontradas em T50. Embora não havendo diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$) observou-se uma tendência dose dependente de redução da contaminação.

Além do baixo número de larvas, outro fato observado foi a ausência quase que completa de larvas infectantes do tipo Strongyloidea, cujos ovos foram prevalentes durante as análises de OPG e cujos exemplares orientaram todas as análises do presente estudo, não sendo possível a identificação da maioria das larvas encontradas. Ademais, acredita-se que os baixos valores de OPG (≤ 2000) tenham influenciado diretamente no grau de contaminação do solo.

Figura 32 - Número de larvas recuperadas da parte aérea do capim-tanzânia em função de doses de T-Mo no solo.



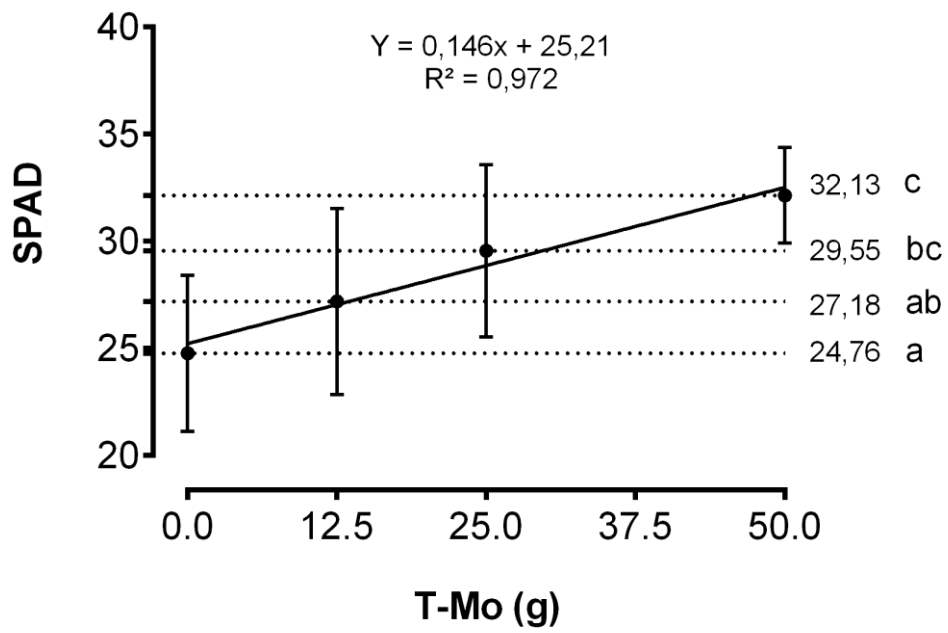
Fonte: Elaborada pela autora.

7.2.4.2 Índice relativo de clorofila

Os dados de eficiência fotossintética das plantas, medidos pelo índice relativo de clorofila e expressos como unidades SPAD, mostraram diferenças significativas ($P < 0,05$) em resposta ao aumento das concentrações de T-Mo no solo, havendo uma correlação positiva e linear entre os parâmetros analisados (**Figura 33**).

A análise prévia da T-Mo adicionada ao solo mostrou que o material apresentava 93,78% de MS e era rico em nitrogênio (N). O teor de N foi expresso indiretamente na forma de proteína (PB), cujo valor médio foi igual a 35,7%.

Figura 33 - Índice relativo de clorofila das folhas de capim-tanzânia em função de doses de T-Mo no solo.



Letras diferentes indicam médias que diferiram significativamente (Tukey, P < 0,05).

Fonte: Elaborada pela autora.

8 DISCUSSÃO

8.1 Identificação e atividades *in vitro* de Mo-HLPs

Moléculas proteicas estão intimamente relacionadas a importantes papéis metabólicos e são reconhecidas como compostos ativos versáteis e eficientes de particular interesse biotecnológico (HAYES; BLEAKLEY, 2018). Pesquisas com *Moringa oleifera* têm mostrado que proteínas e peptídeos presentes em suas sementes constituem moléculas multifuncionais com ampla faixa de aplicações, cuja versatilidade inclui principalmente o relato de propriedades coagulantes/floculantes e atividades antimicrobianas contra diferentes espécies de microorganismos (MEDEIROS et al., 2018; NETO et al., 2017; SHEBEK et al., 2015).

No presente estudo, uma investigação conduzida a partir de uma fração aquosa das sementes de *Moringa oleifera* e direcionada ao controle de parasitos responsáveis por helmintos GI em pequenos ruminantes resultou na identificação e isolamento de diferentes isoformas de peptídeos com propriedades tanto nematicidas quanto floculantes.

A identificação e quantificação de moléculas a partir de sistemas biológicos complexos, em geral, depende inicialmente de um enriquecimento seletivo dos compostos de interesse (DALLAS et al., 2015). Resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa já haviam demonstrado que a maior eficiência anti-helmíntica das sementes de moringa, detectada através de atividade ovicida, correspondia a agentes de baixa massa molecular e que peptídeos floculantes eram fortes candidatos a serem considerados (SALLES et al., 2014a). Aqui, técnica simples de separação por membranas usando diálise sequencial propiciou a obtenção de uma fração proteica de partida ($D > 2$) contendo moléculas entre 2 e 12 kDa, que quando submetida à caracterização eletroforética unidimensional apresentou um perfil de massa molecular compatível com o tamanho dos principais agentes floculantes de moringa, os peptídeos de 6,5 kDa (GASSENSCHMIDT et al., 1995). Contudo, através da análise do material em gel bidimensional observou-se que o único “spot” detectado apresentava, na verdade, massa molecular relativa ligeiramente inferior a 6,5 kDa e um pI acima de 10, caracterizando alta densidade de cargas positivas para os peptídeos ali presentes. A ultrafiltração em membranas tem sido um método eficiente e barato para separação de moléculas. Baptista et al. (2017) já haviam feito uso da técnica para separar frações floculantes de sementes de *M. oleifera*, porém o critério empregado foi o de solubilidade das proteínas (albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas) que envolve diferentes soluções de extração seguidas por várias etapas de diálises.

Embora o foco desse estudo fosse concentrado na identificação de peptídeos nematocidas, as evidências físico-químicas de tamanho e carga detectadas na fração $D > 2$, associada a especulações da literatura (SALLES et al., 2014a), levaram à investigações paralelas para ambas atividades nematocida e flocculante ao longo de todo o processo de isolamento. E de fato, a dupla atividade foi prontamente detectada para a referida fração que mostrou elevada eficiência ovicida e de redução de turbidez.

A heterogeneidade da fração $D > 2$, observada após separação através de RP-HPLC com posterior análise por espectrometria de massa, levou à detecção de quatro isoformas peptídicas, denominadas Mo-HLP1-4, cujas massas variavam entre 4,5 e 4,8 kDa. A presença de variantes naturais parece ser bastante comum entre as proteínas encontradas em moringa. Essa característica já havia sido relatada também para os peptídeos flocculantes de 6,5 kDa: MO2.1 e MO2.2 (GASSENSCHMIDT et al., 1995), para morintides das folhas: mO1 e mO2 (KINI et al., 2017) e para um conjunto de proteínas de ligação à quitina pertencentes à família 2S albuminas: Mo-CBP1-4 (PEREIRA et al., 2011), essas últimas inclusive apresentando misturas complexas de isoformas a partir de proteínas codificadas por genes intimamente relacionados, cujos produtos sofrem diferentes combinações de distintas modificações pós-traducionais (FREIRE et al., 2015, 2019).

Com a determinação da estrutura primária dos Mo-HLPs foi revelada a enorme similaridade das moléculas exatamente com morintides e com outros peptídeos pertencentes a uma típica família de peptídeos antimicrobianos (AMPs) conhecida como hevein-like. Peptídeos hevein-like (HLPs) apresentam boa representatividade no reino vegetal e têm sido identificados em diferentes famílias de plantas, com aumento expressivo de seu repertório nos últimos anos (KINI et al., 2017; WONG et al., 2016, 2017). O termo hevein-like faz referência ao primeiro representante do grupo, que recebeu o nome de hevein. Identificado inicialmente em 1960 a partir do látex fresco de *Hevea brasiliensis* (Seringueira), hevein foi descrito como um peptídeo de 43 resíduos de aminoácidos, rico em cisteína, com massa molecular de 4,7 kDa e forte atividade antifúngica (ARCHER, 1960; PARIJS et al., 1991). De maneira geral, os HLPs são moléculas básicas, pequenas (29-45 aa), que compartilham alguns resíduos bem conservados em suas sequências, incluindo cisteínas (Cys), glicinas (Gly) e resíduos aromáticos. De acordo com o número de Cys presentes, os HLPs são divididos em subfamílias denominadas 6C, 8C e 10C, que seguindo um padrão específico de conectividade podem apresentar de três a cinco ligações dissulfeto (TAM et al., 2015). O alto conteúdo de Cys confere a esses compostos enorme estabilidade estrutural e térmica, além de resistência à proteólise enzimática (SLAVOKHOTOVA et al., 2017).

As análises para determinação do número de Cys em Mo-HLPs, que foram realizadas apenas com a isoforma Mo-HLP3, confirmaram a presença de oito resíduos de Cys, o que classifica os novos peptídeos aqui encontrados como autênticos membros da subfamília 8C-HLP.

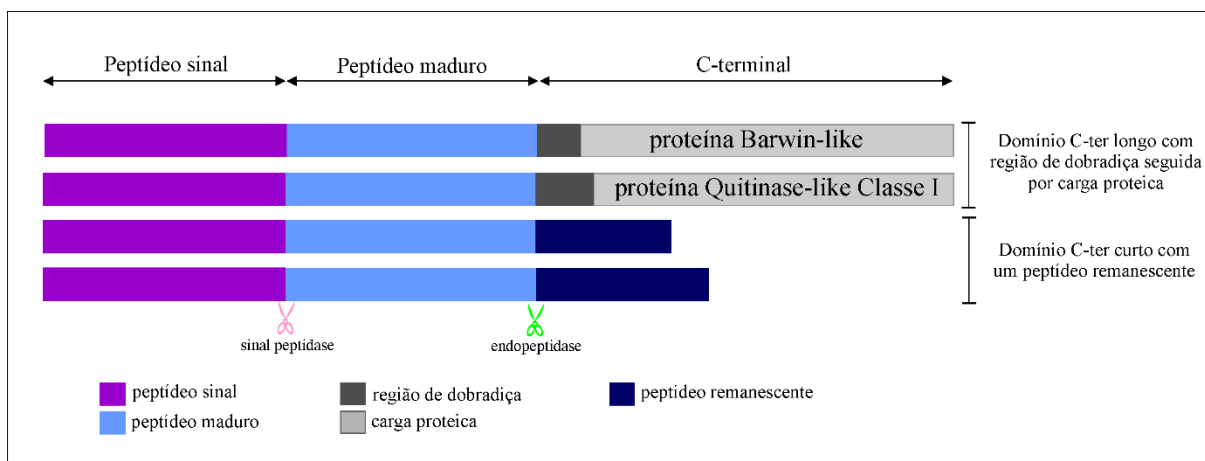
Os segmentos compreendidos entre duas Cys recebem o nome de loops, logo, as subfamílias 6C, 8C e 10C contêm 4, 6 e 8 loops, respectivamente. Os quatro primeiros loops formam um núcleo cisteínico que é comum às três subfamílias (TAM et al., 2015; WONG et al., 2017a). Entre os loops 3 e 4 de HLPs encontra-se uma sequência de aa denominada domínio de ligação à quitina ou domínio hevein, cujo padrão segue a representação $SX\Phi X\Phi CGX4\Phi$ onde: X=qualquer aa e Φ = Trp, Tyr ou Phe. O domínio de ligação à quitina é uma particularidade que distingue os HLPs de outras famílias de AMPs e que lhes permite desempenhar um importante papel na defesa de plantas contra fungos patogênicos (KINI et al., 2017; KOO et al., 1998; WONG et al., 2016, 2017a). Nas sequências dos Mo-HLPs, aqui determinadas, todos os resíduos que compõem o domínio hevein foram identificados e demonstraram o alto grau de conservação da região.

Muitos dos peptídeos de defesa são sintetizados como pré-pró-proteínas contendo alguns domínios adicionais. Assim, encontram-se codificados dentro de sequências precursoras sendo liberados somente após passarem por algum tipo de processamento (FINKINA et al., 2019). Estudos transcriptômicos revelaram que os HLPs ativos são resultado de processamentos pós-traducionais, uma vez que seus representantes são sintetizadas na forma de moléculas precursoras que compartilham um arranjo típico dividido em três domínios (**Figura 34**), incluindo um domínio peptídeo sinal, domínio peptídeo maduro e domínio C-terminal (KINI et al., 2015; WONG et al., 2017). Baseado no tamanho do domínio C-terminal, que varia entre 13 e 254 resíduos de aminoácidos, os precursores biosintéticos podem ainda ser classificados como domínio C-terminal longo ou curto. Precursores com C-terminal longo apresentam uma região de “dobradiça” seguida por uma sequência que codifica cargas proteicas adicionais tais como quitinase-like de classe I ou domínio barwin-like. Já o domínio C-terminal curto consiste de um peptídeo remanescente sem uma carga proteica. Exceto por hevein, os precursores de 8C-HLPs relatados são em sua maioria livres de carga proteica no C-terminal: “protein-cargo-free” (WONG et al., 2017).

Em virtude do aumento expressivo do repertório de HLPs nos últimos anos, hoje, já pode ser observada uma grande diversidade molecular entre 8C-HLPs. Quando comparadas as sequências dos quatro Mo-HLPs entre si e deles com outros 8C-HLPs algumas variações entre

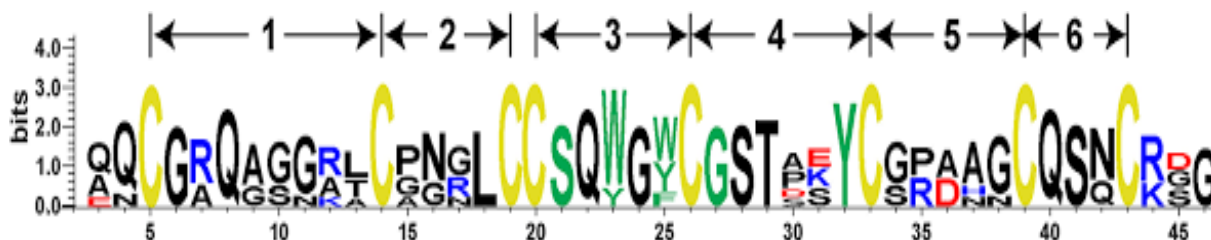
aminoácidos foram encontradas, mas a maioria das substituições observadas foi frequente entre peptídeos da mesma subfamília (**Figura 35**).

Figura 34 - Arranjo esquemático de precursores biossintéticos de peptídeos hevein-like.



Fonte: Adaptada pela autora a partir de Wong et al. (2017)b.

Figura 35 - Sequência logo de 8C-HLPs incluindo morintides.



Fonte: (KINI et al., 2017).

Das variações observadas em Mo-HLPs duas ocorreram entre as seis posições de aa que formam o loop 4 dentro do domínio hevein (**Tabelas 3 e 5**). A serina da segunda posição que é altamente conservada entre HLPs (ARCHER, 1960; KOO et al., 1998; WONG et al., 2017a, 2017b) foi substituída por uma treonina em Mo-HLPs, nesse caso ambos aa apresentam as mesmas características químicas de polaridade e carga (polar e neutro) e provavelmente não devam ocasionar grandes mudanças de atividade. O outro ponto de variação foi entre os aa da quinta posição do loop 4 que em Mo-HLPs consistiram de ácido glutâmico (Mo-HLP3 e 4), lisina (Mo-HLP1) ou alanina (Mo-HLP2), aa com cargas negativa, positiva e neutra, respectivamente (**Tabela 3**). Serina juntamente com ácido glutâmico e lisina são substituições

comuns nessa posição (**Figura 35**), porém resíduos como prolina já foram relatados para as isoformas de 8C-HLPs encontrados em *Vaccaria hispanica* (vaccatides) e alanina, até então, só havia sido reportada em 8C-HLPs de gimnosperma (WONG et al., 2016, 2017a).

Os membros das diferentes famílias de AMPs, incluindo hevein-like apresentam cerca de 17% de seus aminoácidos carregados positiva ou negativamente e as rede de cargas têm implicações diretas na atividade contra microrganismos. De modo geral, a maioria de peptídeos pertencentes às famílias de AMPs possuem rede de cargas que variam de 0 a +10, sendo +4.6 considerada uma média do balanço entre a rede de cargas de uma molécula (HAMMAMI et al., 2009).

No que se refere ao potencial ativo das moléculas há uma predominância da relação com processos antifúngicos (51%), seguido por ações antibacterianas (33%), antivirais (10%) e inseticidas (3%) (HAMMAMI et al., 2009). O alvo principal da maioria desses peptídeos são estruturas externas da membrana plasmática dos agentes invasores cuja interação seria facilitada pelas características eletrostáticas dos resíduos catiônicos (NAWROT et al., 2014).

Em *M. oleifera*, além de propriedades antimicrobianas, os peptídeos catiônicos de suas sementes estão primariamente envolvidos com efeitos de coagulação/floculação de coloides em suspensão através de mecanismos bem conhecidos de adsorção e neutralização de cargas (GASSENSCHMIDT et al., 1995; NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995). Sabendo que partículas dissolvidas na água apresentam carga de superfície negativa, a adição de compostos carregados positivamente age neutralizando parte da carga superficial reduzindo a repulsão eletrostática e levando à formação de pequenos agregados que por colisão podem formar flocos maiores facilitando a remoção por sedimentação (GASSENSCHMIDT et al., 1995; VILLASEÑOR-BASULTO et al., 2018). Baseado em mecanismos de coagulação/floculação foi que Sengupta et al. (2012) observaram que extratos das sementes de moringa também eram capazes de reduzir eficazmente o número de ovos de helmintos em água de irrigação, pois esses também apresentariam carga de superfície negativa havendo uma correlação positiva entre redução de turbidez e de ovos.

O contato individual dos Mo-HLPs tanto com partículas de argila em suspensão quanto com os ovos de nematoides GI mostrou existir uma relação entre atividade floculante e nematicida, sendo a eficiência previamente detectada na fração $D > 2$ relacionada à presença de tais peptídeos. Contudo, também foi observado que o grau de atividade é variável entre as isoformas a depender da função. Especula-se que essa variação pode ser inclusive explicada, em parte, pelas sequências de aa obtidas no presente estudo.

No caso da atividade flocculante, os Mo-HLP1 e 2, que foram os mais eficientes, apresentando 89% de redução da turbidez na concentração de 5 µg/mL de solução, tiveram substituições entre aa de carga neutra e positiva (**Tabela 3**). Uma Lys e Gln em Mo-HLP1 foram substituídas, respectivamente, por Ala e Lys em Mo-HLP2, conferindo a ambas as isoformas carga líquida positiva (+1). Por outro lado, as variações de aa entre Mo-HLP3 e 4, que necessitaram de 10 µg/mL de solução para demonstrarem redução da turbidez, envolveram resíduos positivo (Arg), negativo (Glu) e neutros (Val, Ser e Gln) resultando no saldo final de cargas neutras para ambos, logo, menos positivos que os dois primeiros. Entretanto, informações capazes de responder a diferença de atividade entre Mo-HLP3 e 4 (89 x 67 % de redução com a mesma concentração) provavelmente estejam contidas na diferença entre aa não identificados.

Já sobre a atividade de inibição da eclosão dos ovos, Mo-HLP3 e 1 foram os mais eficientes (ressaltando que Mo-HPL4 não foi avaliado), nesse caso o mesmo raciocínio de diferença de cargas não seria o mais adequado para explicar tais diferenças de atividade. Como a previsão da estrutura tridimensional de um peptídeo é um passo importante na pesquisa peptidômica, pois a estrutura do peptídeo também afeta sua função (DALLAS et al., 2015), esse poderia ser um caminho para obter informações. No entanto, as estruturas 3D aqui previstas para os Mo-HLPs, baseadas apenas em sequências parciais, mostraram não haver diferenças tão drásticas entre as isoformas.

Até hoje, WSMoL havia sido o único agente proteico de moringa a ser realmente identificado e comprovado como um dos responsáveis pelas propriedades anti-helmínticas da espécie. A lectina inibiu em cerca de 40% a eclosão de ovos (250 µg/mL) e em 64% o desenvolvimento larval (125 µg/mL) (MEDEIROS et al., 2018). Embora em concentrações bem superiores, as diferentes isoformas de Mo-HLPs (6,4 mg/mL), aqui identificadas, mostraram-se eficientes agentes ovicidas, inibindo entre 74 e 100% a taxa de eclosão. Diferente dos Mo-HLPs, WSMoL é uma proteína ácida e os resultados com a lectina revelaram que sua atividade provavelmente estaria ligada à afinidade por estruturas moleculares presentes nos ovos e nas larvas, tais como resíduos de carboidratos (MEDEIROS et al., 2018).

Assim, considerando as diferenças de atividade entre as isoformas aqui encontradas, é bastante provável que outros mecanismos de ação, além de interações entre cargas, estejam envolvidos com a atividade nematicida de Mo-HLPs. A presença de domínio de ligação à quitina pode ser um caminho para futuras elucidações visto que quitina é um dos constituintes presentes nas cascas dos ovos de alguns nematoides como *Haemonchus contortus* (MANSFIELD; GAMBLE; FETTERER, 1992).

Devido à ação antimicrobiana, o uso biotecnológico de HLPs tem sido realizado primariamente para produção de plantas transgênicas visando espécies mais resistentes a microrganismos patogênicos (GAO et al., 2014). Em estudo recente, Chen et al. (2019) obtiveram com sucesso mudas de aspargos transgênicos resistentes à murcha do caule após integração de gene hevein-like utilizando transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* (CHEN et al., 2019; GAO et al., 2014). No entanto, as características físico-químicas e versatilidade dessas moléculas sugerem potencial para uma gama de outras aplicações incluindo atuação como matriz para enxertos metabolicamente estáveis e peptídeos terapêuticos biodisponíveis para uso oral (WONG et al., 2017).

8.2 Utilização de moringa no controle de nematoides GI

Avaliações *in vitro* são apenas os primeiros passos para validação científica de um candidato a fitoterápico, onde considera-se o parasito livre das condições externas, ambientais ou do hospedeiro, permitindo a detecção das propriedades antiparasitárias e caracterização dos possíveis compostos ativos (COSTA et al., 2002).

Aqui nós identificamos e caracterizamos apenas alguns dos vários tipos de compostos anti-helmínticos presentes nas sementes de moringa, e cujas informações podem futuramente subsidiar o desenvolvimento de novas drogas. Contudo, para avaliar a atividade fitoterápica de moringa foi considerado o conjunto de todos os compostos ativos presentes, e para tanto, utilizou-se tanto a farinha bruta das sementes desengorduradas, farelo de moringa (F-Mo), quanto o extrato aquoso desse farelo (EAF-Mo), sendo o extrato uma versão mais seletiva dos compostos ativos solúveis em água.

Como a melhor forma de avaliar um composto fitoterápico é a partir da realização de testes que incidam sobre diferentes estágios de desenvolvimento do parasito, a atividade do EAF-Mo, usado no teste *in vivo*, foi previamente avaliada através do teste *in vitro* de eclosão dos ovos, como também avaliou-se seu possível efeito de interferir na capacidade migratória de larvas infectantes L3. Para helmintoses GI de pequenos ruminantes, testes *in vitro* usando L3 de *Haemonchus contortus* são considerados a melhor maneira de realizar *screening* para atividade anti-helmíntica de compostos vegetais (HERNÁNDEZ-VILLEGAS et al., 2011). Ao utilizar o teste de migração, considera-se, dentre outros fatores, que a colonização parasitária do abomaso do hospedeiro depende inicialmente da motilidade das larvas infectantes (ALBA-HURTADO; MUÑOZ-GUZMÁN, 2013). Todavia, nas condições avaliadas, os melhores resultados alcançados para o EAF-Mo foram aqueles referentes aos efeitos ovicidas (94% de

inibição -100 mg/mL) comparados ao seu desempenho no teste de migração (< 30% de inibição – 50 mg/mL). Tais resultados são coerentes com as diferentes quantidades de material utilizadas em cada um dos ensaios. De fato, ovos e larvas mais jovens (L1 e L2) são estágios de desenvolvimento mais sensíveis a tratamentos do que larvas L3, e essas últimas, geralmente, requerem maiores concentrações para resultados efetivos (BESIER et al., 2016). No entanto, por algumas limitações da amostra em questão, associadas às limitações da técnica, não foi possível a verificação do material em doses superiores.

Testes *in vitro* respondem pela maioria (cerca de 96%) dos estudos que reivindicam atividade anti-helmíntica de compostos naturais, isso deve-se a rapidez de execução e ao custo relativamente baixo dos testes. No entanto, nem sempre refletem a ação dos materiais quando avaliados em testes *in vivo*, exatamente por não considerarem aspectos cruciais como absorção e biodisponibilidades dos agentes ativos (AREMU; FINNIE; VAN STADEN, 2012; CASTAGNA et al., 2019).

Na realização do presente estudo, o acompanhamento de ovinos Santa Inês infectados com nematoides GI (3.000 > OPG < 5.000) e prevalência de *H. contortus* superior a 90%, submetidos a um bom plano nutricional, mostrou que os animais não apresentaram sinais fisiopatológicos decorrentes da infecção independente dos tratamentos administrados. Sabendo que existe uma complexidade de interações entre nutrição e infecções por nematoides GI em ruminantes, uma provável explicação acerca da ausência de efeitos patogênicos pode estar associada a resiliência dos animais em resposta a um fornecimento nutricional suficiente ou talvez a uma baixa infecção artificial.

Um dos principais efeitos fisiopatológicos de altos níveis de infecção por nematoides GI é a redução da ingestão voluntária de alimento em ruminantes (HOSTE et al., 2016). Porém, durante todo o experimento, o que se observou foi boa ingestão alimentar para os animais de todos os grupos resultando em bons desempenhos com ganhos de pesos médios em torno de 149 g/dia.

Devido aos hábitos hematofágicos, anemia é o principal sinal clínico observado em animais infectados com *H. contortus* (HOSTE et al., 2016). A anemia pode ser estimada, através de testes qualitativos por observação da cor das mucosas, sendo o FAMACHA[®] uma ferramenta prática e bastante utilizada; e pode ser medida de forma mais confiável por métodos laboratoriais como determinação dos níveis de VG (%). Mesmo nas semanas iniciais do experimento não foram observados efeitos graves nos parâmetros hematológicos, e embora alguns animais do G4 (não tratados) tenham apresentado grau 3 de FAMACHA[®] em dias específicos, o exame sanguíneo apontou valores de VG normais para esses animais. As

condições experimentais utilizadas podem ter contribuído para melhorar a resposta dos hospedeiros, tornando o desafio insuficiente para causar alterações nesses parâmetros.

Estudos mostram existir uma correlação significativa entre a perda de sangue, o número de vermes e número de ovos produzidos, pois o sangue serve para garantir o crescimento e a reprodução dos vermes. O processo fisiopatológico depende das reservas de ferro disponíveis no animal hospedeiro e a depleção dos níveis de ferro seria o primeiro fator nutricional limitante capaz de explicar a ocorrência de efeitos graves associados à infecção por *H. contortus* (HOSTE et al., 2016).

Em relação as análises coproparasitológicas também foi mostrado que todos os animais foram capazes de desenvolver boa resposta no que diz respeito ao controle da infecção ao final do experimento, e isso foi demonstrado por reduções de ovos nas fezes variando entre 52 e 88% ($P > 0,05$). Tratamentos considerados muito eficientes são aqueles que apresentam atividade $> 95\%$, porém, nem mesmo o Oxfendazol atingiu tal resultado, reforçando estudos que já demonstram resistência a essa classe de anti-helmínticos (SANTOS et al., 2017; BABJÁK et al., 2018). O mais provável é que o estado nutricional tenha interferido diretamente na maneira como os animais enfrentaram a infecção.

Estudos mostram que dietas com diferentes níveis de suplementação proteica têm efeitos sobre a fisiopatologia de animais infectados com *H. contortus*. Os registros apontam um efeito positivo da suplementação sobre a redução da contagem de ovos nas fezes de caprinos confinados, mostrando que dietas mais ricas em proteínas são capazes de protegerr os animais do estabelecimento e desenvolvimento da infecção (CAN; HOHENHAUS; MURRAY, 2017).

Desnutrição é considerada uma fonte primária relacionada ao problema de parasitoses, e a manipulação nutricional é vista como um método complementar de controle de nematoides GI (SALGADO et al., 2017). No entanto, vale ressaltar que a dieta fornecida aos animais durante esse estudo (DAC) embora seja excelente do ponto de vista nutricional, a mesma é recomendada apenas por período limitado de tempo, 60 a 90 dias, sob o risco de aumentar a probabilidade da ocorrência de distúrbios metabólicos nos animais, tais como acidose ruminal, se fornecida por longos períodos (ROGÉRIO et al., 2018).

Contudo, mesmo diante da DAC usada no presente estudo não podemos deixar de considerar que a contagem de ovos nas fezes mostrou uma redução de forma bastante acentuada ao final das quatro primeiras semanas, redução essa ocorrida apenas nos grupos em que os animais tinham sido tratados, seja com a droga sintética, seja com moringa, mas particularmente com o EAF-Mo, que reduziu a contagem em aproximadamente 59%. Assim, esses resultados sugerem que talvez as condições experimentais podem ter mascarado, até certo ponto, os efeitos

que intrinsecamente estariam relacionados apenas à presença dos agentes ativos, uma vez que não foram encontrados registros de estudos relacionados usando esse mesmo tipo de dieta durante avaliação da eficácia de tratamentos fitoterápicos.

Além disso, estudos *in vivo* envolvem uma série de fatores aos quais estão associadas muitas variações de resultados. Dentre esses fatores destacam-se, por exemplo, o conjunto de constituintes da espécie vegetal, o tipo de solvente usado para preparar o extrato, a forma de administração e as concentrações testadas.

Acredita-se que a ingestão de bioativos acima de um limiar suficiente de concentração e por tempo suficiente pode sim afetar e/ou regular a biologia de diferentes estágios de desenvolvimento no ciclo de vida dos nematoides GI (HOSTE et al., 2016). Assim, os resultados encontrados aqui para o uso de moringa como fitoterápico são vistos como inconclusivos. A condução de mais investigações sob diferentes cenários tais como tipos de dietas, dosagens diversas, variação na frequência de administração dos compostos ativos e formas de administração dos materiais, podem revelar resultados interessantes e bem diferentes dos encontrados no presente estudo.

Outro ponto importante observado nesse estudo foi o fato de a torta de moringa (T-Mo) ter demonstrado potencial de uso múltiplo no solo, podendo vir a atuar como um adubonematicida. A tendência demonstrada pela T-Mo em reduzir a contaminação de forragens foi associada a um aumento significativo ($P < 0,05$) de unidades SPAD em capim-tanzânia cultivado em vasos.

Valores de SPAD são proporcionais a teores relativos de clorofila presente nas folhas e os estudos mostram existir uma correlação entre a intensidade do verde, o teor de clorofila e a concentração de N. Essa relação é atribuída, principalmente, ao fato de que 50 a 80 % do N total das folhas encontra-se como parte integrante de proteínas que estão associadas aos cloroplastos (XIONG et al., 2015).

O fato de o teor de clorofila do capim-tanzânia ter aumentado gradativamente frente a variações nas doses de T-Mo pode ser atribuído a uma maior disponibilidade de N no solo sob a forma de proteínas, que se mostraram abundantes na T-Mo. A mesma relação linear foi observada para os efeitos nematicidas.

Salles et al. (2018) relataram que adubos minerais como a ureia também possuem propriedades nematicidas com capacidade de reduzir o número de larvas em forragem. No entanto, o estudo mostrou que a eficiência da ureia foi inversamente proporcional à quantidade de N aplicada, o que difere dos resultados observados para moringa. A partir desse resultado e sabendo que a ureia é uma fonte que apresenta altas perdas de N por volatilização na forma de

amônia, pode-se inferir que o aproveitamento de adubos nematicidas orgânicos como a moringa mostram-se mais vantajosos em ambos os aspectos.

Além disso, componentes nitrogenados são um fator limitante na dieta dos ruminantes (HOSTE et al., 2016), e a fertilização nitrogenada com moringa parece ter potencial para melhorar a qualidade da pastagem favorecendo o aumento de recursos nutricionais, o que indiretamente contribuiria para aumentar a resiliência dos animais frente a parasitoses. Ademais, o uso de moringa como estratégia para o manejo integrado de parasitose tem a vantagem de agregar outros aspectos de sustentabilidade, uma vez que a torta é um subproduto industrial que não dispõe de uma destinação ambientalmente adequada.

9 CONCLUSÕES

Os peptídeos Mo-HLPs isolados de sementes *Moringa oleifera* são moléculas catiônicas pertencentes à família de peptídeos hevein-like e apresentam eficiente atividade anti-helmíntica *in vitro* sobre ovos de nematoides gastrintestinais, particularmente de *Haemonchus contortus*.

Mo-HLPs caracterizam-se como moléculas multifuncionais e são descritos como novos agentes coagulantes/floculantes de *Moringa oleifera*.

O farelo de *Moringa oleifera* e seu respectivo extrato não apresentam atividade anti-helmíntica quando administrados *in vivo* em ovinos mantidos sob dieta de elevado valor nutricional.

A torta das sementes de *Moringa oleifera* apresenta um efeito adubo nematicida dose-dependente e pode ser uma opção interessante para compor sistemas integrados de controle parasitário e de produção agroecológica.

10 PERSPECTIVAS

A identificação de peptídeos nematicidas representa um passo importante para ampliar o conhecimento acerca dos compostos envolvidos com propriedades anti-helmínticas de moringa. Há, porém, a necessidade de realização de estudos adicionais no sentido de compreender melhor os principais mecanismos de ação envolvidos com as atividades detectadas para tais moléculas.

A princípio, os dados físico-químicos, obtidos pela caracterização dos peptídeos, poderão vir a ser utilizados para estabelecer padrões de controle de qualidade para ação nematicida. Existe a perspectiva de que essas moléculas possam ser utilizadas como marcadores para validação de técnicas que visem comparar a atividade de sementes colhidas sob diferentes condições, regiões ou épocas do ano.

Uma vez que os efeitos anti-helmínticos de moringa decorrem da ação de diferentes compostos, estudos de bioprospecção e caracterização devem ser continuados a fim de investigar quais são os principais agentes nematicidas, a quais classes químicas pertencem e como seus efeitos se relacionam. Uma visão mais abrangente será imprescindível para estabelecer as condições capazes de garantir a máxima eficiência conjunta dos compostos ativos.

Quanto às estratégias aqui abordadas para o uso prático de moringa no controle de helmintoses, algumas melhorias voltadas a ajustes de parâmetros e exploração de novas condições deverão ser avaliadas, sobretudo na perspectiva de torná-las ferramentas acessíveis a produtores e incentivar práticas alternativas de controle que sejam eficientes e mais sustentáveis.

REFERÊNCIAS

- ABIOLA, O. N. Polymers for coagulation and flocculation in water treatment. In: DAS, R. (Ed.). **Polymeric Materials for Clean Water**. Springer International Publishing, 2018. p. 77–92.
- AFZAL, H. et al. Role of Biotechnology in Improving Human Health. **Journal of Molecular Biomarkers J & Diagnosis**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2016.
- AGRAWAL, H.; SHEE, C.; SHARMA, A. K. Isolation of a 66 kDa protein with coagulation activity from seeds of *Moringa oleifera*. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 418–421, 2007.
- AGYARE, C. et al. An ethnopharmacological survey and in vitro confirmation of the ethnopharmacological use of medicinal plants as anthelmintic remedies in the Ashanti region, in the central part of Ghana. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, p. 255–263, 2014.
- ALBA-HURTADO, F.; MUÑOZ-GUZMÁN, M. A. Immune responses associated with resistance to Haemonchosis in sheep. **BioMed Research International**, p. 1–11, 2013.
- ALBUQUERQUE, A. C. A. et al. Development of *Haemonchus contortus* resistance in sheep under suppressive or targeted selective treatment with monepantel. **Veterinary Parasitology**, v. 246, p. 112–117, 2017.
- ALI, E. N. et al. Production of natural coagulant from *Moringa oleifera* seed for application in treatment of low turbidity water. **J. Water Resource and Protection**, v. 2, p. 259–266, 2010.
- AL-MALKI, A. L.; EL RABEY, H. A. The antidiabetic effect of low doses of *Moringa oleifera* Lam. seeds on streptozotocin induced diabetes and diabetic nephropathy in male rats. **BioMed research international**, p. 1–13, 2015.
- ALMANZOR, I. J. A. et al. In vivo trials of *Moringa oleifera* Lam. extracts as antischistosomal treatment on *Schistosoma japonicum* infected mice. **Sanghiran Multidisciplinary Journal**, v. 2, p. 49–56, 2014.
- ALUKO, O.; BRAI, M. R.; ADELORE, A. O. Evaluation of sensory attributes of snack from maize-moringa seed flour blends. **International Journal of Nutrition and Food Engineering**, v. 7, n. 10, p. 944–946, 2013.
- AMARANTE, A. F. T. do. **Os parasitas de ovinos**. São paulo: UNESP, 2014.
- AMRAN, A. H. et al. Effectiveness of natural coagulant in coagulation process: A Review. **International Journal of Engineering & Technology**, v. 7, n. 3.9, p. 34–37, 2018.
- ARCHER, B. L. The proteins of *Hevea brasiliensis* latex. 4. Isolation and characterization of crystalline hevein. **The Biochemical journal**, v. 75, p. 236–240, 1960.
- AREMU, A. O.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Potential of South African medicinal plants used as anthelmintics - Their efficacy, safety concerns and reappraisal of current

screening methods. **South African Journal of Botany**, v. 82, p. 134–150, 2012.

AUSTIN, H. P. et al. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyestherase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 19, p. 4350–4357, 2018.

BABIKER, E. E. et al. Effect of partial replacement of alfalfa hay with Moringa species leaves on milk yield and composition of Najdi ewes. **Tropical Animal Health and Production**, v. 48, p. 1427–1433, 2016.

BABJÁK, M. et al. Anthelmintic resistance in goat herds — In vivo versus in vitro detection methods. **Veterinary Parasitology**, v. 254, p. 10–14, 2018.

BAKARE, A. G. et al. Potential of ethno-veterinary medicine in animal health care practices in the South Pacific Island countries : a review. **Tropical Animal Health and Production**, 2020.

BALKE, I.; ZELTINS, A. Use of plant viruses and virus-like particles for the creation of novel vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 145, p. 119–129, 2019.

BAPTISTA, A. T. A. et al. Protein fractionation of seeds of *Moringa oleifera* Lam and its application in superficial water treatment. **Separation and Purification Technology**, v. 180, p. 114–124, 2017.

BERLINCK, R. G. De S. Bioprospecção no Brasil: um breve histórico. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, 2012.

BESIER, R. B. et al. The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. In: GASSER, R.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. V. (Eds.). **Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends**. San Diego: Academic Press, 2016. chapter four, v. 93, p. 95-143.

BEYENE, T. Veterinary drug residues in food-animal products: Its risk factors and potential effects on public health. **Journal of Veterinary Science & Technology**, v. 07, n. 01, p. 1–7, 2015.

BICHI, M. H. A Review of the applications of *Moringa oleifera* seeds extract in water treatment. **Civil and Environmental Research**, v. 3, n. 8, p. 7610–7615, 2013.

BINA, B. et al. Effectiveness of *Moringa oleifera* coagulant protein as natural coagulant aid in removal of turbidity and bacteria from turbid waters. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 7, n. 4, p. 430–432, 2010.

BIZIMENYERA, E. S. et al. In vitro activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3-4, p. 336–343, 2006.

BOLTO, B.; GREGORY, J. Organic polyelectrolytes in water treatment. **Water Research**, v. 41, n. 11, p. 2301–2324, 2007.

BORETTI, A.; ROSA, L. Reassessing the projections of the World Water Development Report. **npj Clean Water**, v. 2, n. 15, p. 1–6, 2019.

BORGES, D. G. L.; BORGES, F. DE A. Plants and their medicinal potential for controlling gastrointestinal nematodes in ruminants. **Nematoda**, v. 3, p. 1–13, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.

BRANDT, M. J. et al. Storage, Clarification and Chemical Treatment. In: **Twort's Water Supply**. seventh ed. United Kingdom: Butterworth-Heinemann, 2017. p. 932.

BROIN, M. et al. Flocculent activity of a recombinant protein from *Moringa oleifera* Lam. seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 114–119, 2002.

BYERS, S. R.; KRAMER, J. W. Normal Hematology of Sheep and Goats. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Eds.). **Schalm's veterinary hematology**. 6th ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2010. p. 1206.

CABARDO, D. E.; PORTUGALIZA, H. P. Anthelmintic activity of *Moringa oleifera* seed aqueous and ethanolic extracts against *Haemonchus contortus* eggs and third stage larvae. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 5, n. 1, p. 30–34, 2017.

CAN, T. V.; HOHENHAUS, M. A.; MURRAY, P. J. The effect of different levels of crude protein on the pathophysiology of *Haemonchus contortus* infection in 2-year-old Boer dry does under confined conditions. **Animal Production Science**, v. 57, p. 719–725, 2017.

CÂNDIDO, E. DE S. et al. The use of versatile plant antimicrobial peptides in agribusiness and human health. **Peptides**, v. 55, p. 65–78, 2014.

CARVALHO, A. P. DE; FERREIRA, P. C. G. Biotecnologia da Biodiversidade : Um Novo Instituto Brasileiro. **Revista virtual de química**, v. 5, n. 3, p. 328–342, 2013.

CASELANI, K. Resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR (Impr.)**, v. 17, p. 189–197, 2014.

CASTAGNA, F. et al. Use of complementary natural feed for gastrointestinal nematodes control in sheep: Effectiveness and benefits for animals. **Animals**, v. 9, n. 12, p. 1037, 2019.

CHARLIER, J. et al. Mind the gaps in research on the control of gastrointestinal nematodes of farmed ruminants and pigs. **Transboundary and Emerging Diseases**, p. 1–18, 2017.

CHAROONNART, P.; PURTON, S.; SAKSMERPROME, V. Applications of microalgal biotechnology for disease control in aquaculture. **Biology**, v. 7, n. 24, 2018.

CHEUNG, P. C. W. A historical review of the benefits and hypothetical risks of disinfecting drinking water by chlorination. **Journal of Environment & Ecology**, v. 8, n. 1, p. 73–145, 2017.

- CHOY, S. Y. et al. A review on common vegetables and legumes as promising plant-based natural coagulants in water clarification. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, p. 367–390, 2015.
- COELHO, J. S. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, n. 7, p. 934–938, 2009.
- COLES, G. C. et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, n. 1-2, p. 35–44, 1992.
- CORIOLOANO, M. C. et al. Antibacterial lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) has differential action on growth, membrane permeability and protease secretory ability of Gram-positive and Gram-negative pathogens. **South African Journal of Botany**, *In press*, 2019.
- COSTA, C. T. C. et al. Efeito ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 11, n. 2, p. 57–60, 2002.
- COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Doenças parasitárias em ruminantes no semi-árido brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 563–568, 2009.
- CRITTENDEN, J. C. et al. Coagulation and Flocculation. In: **MWH's Water Treatment: Principles and Design**. Third ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2012. p. 1920.
- DALLAS, D. C. et al. Current peptidomics: Applications, purification, identification, quantification, and functional analysis. **Proteomics**, v. 15, p. 1026–1038, 2015.
- DELELEGN, A.; SAHILE, S.; HUSEN, A. Water purification and antibacterial efficacy of *Moringa oleifera* Lam. **Agriculture and Food Security**, v. 7, n. 25, p. 1-10, 2018.
- DEMELER, J.; KÜTTLER, U.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Adaptation and evaluation of three different in vitro tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1-2, p. 61–70, 2010.
- DHAKAR, R. C. et al. Moringa: The herbal gold to combat malnutrition. **Chronicles of Young Scientists**, v. 2, n. 3, p. 119–125, 2011.
- DONG, L.; ZHANG, I.; DIAO, Q. Effect of dietary supplementation of *Moringa oleifera* on the production performance and fecal methanogenic community of lactating dairy cows. **Animals**, v. 9, n. 262, p. 1-12, 2019.
- DOSSA, L. H. et al. Production objectives and breeding practices of urban goat and sheep keepers in West Africa: regional analysis and implications for the development of supportive breeding programs. **SpringerPlus**, v. 4, n. 281, p. 1–12, 2015.
- EMERENCIANO NETO, J. V. et al. Avaliação econômica da produção de carne ovina em pastagens cultivadas. **Custos e agronegócio on line**, v. 13, Edição Especial, p. 304–319, 2017.

- EMIRU, B. et al. Epidemiology of Gastrointestinal Parasites of Small Ruminants in Gechi District, Southwest Ethiopia. **Advances in Biological Research**, v. 7, n. 5, p. 169–174, 2013.
- EMMANUEL, S. A. et al. *Moringa oleifera* seed-cake, alternative biodegradable and biocompatibility organic fertilizer for modern farming. **Agriculture and Biology Journal of North America**, v. 2, n. 9, p. 1289–1292, 2011.
- FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. DE. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. p. 730.
- FALOWO, A. B. et al. Multi-functional application of *Moringa oleifera* Lam. in nutrition and animal food products: A review. **Food Research International**, v. 106, p. 317–334, 2018.
- FAO. 2018. **Live Animals**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>>. Acesso em: 25 fev. 2020.
- FERNANDES, D. M. et al. *Moringa oleifera*: A potential source for production of biodiesel and antioxidant additives. **Fuel**, v. 146, p. 75–80, 2015.
- FERREIRA, D. F. SISVAR : A Computer statistical analysis system. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.
- FERREIRA, T. S. et al. Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 290–298, 2014.
- FREIRE, J. E. C. et al. Mo-CBP3, an antifungal chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds, is a member of the 2S albumin family. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–24, 2015.
- FREIRE, J. E. C. et al. Mo-CBP 3, a 2S albumin from *Moringa oleifera*, is a complex mixture of isoforms that arise from different post-translational modifications. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 140, p. 68–77, 2019.
- FRIGHETTO, R. T. S. et al. O Potencial da espécie *Moringa oleifera* (Moringaceae). I . A Planta como Fonte de Coagulante Natural no Saneamento de Águas e como Suplemento Alimentar. **Revista Fitos**, v. 3, p. 78–88, 2007.
- GASSENSCHMIDT, U. et al. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1243, n. 3, p. 477–481, 1995.
- GCULA (**Guide for the Care and Use of Laboratory Animal**). Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C., USA (1996). <http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>
- GEARY, T. G.; SAKANARI, J. A.; CAFFREY, C. R. Anthelmintic Drug Discovery: Into the Future. **Journal of Parasitology**, v. 101, n. 2, p. 125–133, 2015.
- GHEBREMICHAEL, K. A. et al. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. **Water research**, v. 39, n. 11, p. 2338–44, 2005.

- GODINO, M.; ARIAS, C.; IZQUIERDO, M. I. *Moringa oleifera*: Potential areas of cultivation on the Iberian Peninsula. **Acta Horticulturae**, v. 1158, p. 405–412, 2017.
- GOPALAKRISHNAN, L.; DORIYA, K.; KUMAR, D. S. *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. **Food Science and Human Wellness**, v. 5, n. 2, p. 49–56, 2016.
- GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.
- GUILHERME, R. D. F. et al. Characterization and typology of sheep and goat production systems in the State of Paraíba, a semi-arid region of northeastern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 2163–2178, 2017.
- GUNDRY, R. L. et al. Preparation of Proteins and Peptides for Mass Spectrometry Analysis in a Bottom-Up Proteomics Workflow. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 90, n. 1, p. 10.25.1–10.25.23, 2009.
- GUPTA, S. et al. Nutritional and medicinal applications of *Moringa oleifera* Lam.-Review of current status and future possibilities. **Journal of Herbal Medicine**, v. 11, p. 1–11, 2017.
- HAMMAMI, R. et al. PhytAMP : a database dedicated to antimicrobial plant peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 4, p. 963–968, 2009.
- HAMZA, A. A. Ameliorative effects of *Moringa oleifera* Lam seed extract on liver fibrosis in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 345–355, 2010.
- HAYES, M.; BLEAKLEY, S. Peptides from plants and their applications. In: **Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2018. chapter 21, p. 603–622.
- HELDRICH K. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15th ed. Gaithersburg, MD: AOAC; 1990.
- HERNÁNDEZ-VILLEGAS, M. M. et al. Ovicidal and larvicidal activity of the crude extracts from *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 179, p. 100–106, 2011.
- HOSTE, H. et al. Interactions Between Nutrition and Infections With *Haemonchus contortus* and Related Gastrointestinal Nematodes in Small Ruminants. In: GASSER, R.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. V. (Eds.). **Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends**. San Diego: Academic Press, 2016. chapter seven, v. 93, p. 239–351.
- ISLAM, S. et al. Epidemiology of gastrointestinal parasites of small ruminants in Mymensingh, Bangladesh. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 4, n. 4, p. 356–362, 2017.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Wiley-Blackwell, 1993. 420 p.

KANDIL, O. M. et al. Anthelmintic efficacy of *Moringa oleifera* seed methanolic extract against *Fasciola hepatica*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 42, n. 3, p. 391–401, 2018.

KILBANE, J. J. I. Future applications of biotechnology to the energy industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 86, p. 4–7, 2016.

KINI, S. G. et al. Morintides: Cargo-free chitin-binding peptides from *Moringa oleifera*. **BMC Plant Biology**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2017.

KLONGSIRIWET, C. et al. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, p. 127–134, 2015.

KOO, J. C. et al. Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1382, n. 1, p. 80–90, 1998.

KOTZE, A. C.; PRICHARD, R. K. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. **Advances in Parasitology**, v. 93, n. 1, p. 397–428, 2016.

KOU, X. et al. Nutraceutical or pharmacological potential of *Moringa oleifera* Lam. **Nutrients**, v. 10, n. 3, 2018.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 225, n. 15, p. 680–685, 1970.

LAMBERTZ, C. et al. Endoparasitic infections and prevention measures in sheep and goats under mountain farming conditions in Northern Italy. **Small Ruminant Research**, v. 164, p. 94–101, 2018.

LATIMER JUNIOR, G. W. (Ed). **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 20th ed. Rockville: AOAC, 2016.

LIRA, M. A. A. et al. Doenças do sistema digestório de caprinos e ovinos no semiárido do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 193–198, 2013.

LISITA, F. O.; JULIANO, R. S.; MOREIRA, J. S. **Cultivo e Processamento da Moringa na alimentação de Bovinos e Aves**. Corumbá, MS: Embrapa Pantanal, 2018. 6 p. (Circular Técnica, 119).

LUZ, L. D. A. et al. Structural characterization of coagulant *Moringa oleifera* Lectin and its effect on hemostatic parameters. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 31–38, 2013.

MALAJOVICH, M. A. **Biotechnologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Biotechnologia: ensino e divulgação, 2016.

- MANSFIELD, L. S.; GAMBLE, H. R.; FETTERER, R. H. Characterization of the eggshell of *Haemonchus Contortus*-I. Structural components. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 3, p. 681–686, 1992.
- MAQBOOL, I. et al. Integrated parasite management with special reference to gastrointestinal nematodes. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 1, p. 1–8, 2017.
- MATOS, A. F. I. M. et al. Attempt to control *Haemonchus contortus* in dairy goats with Barbervax®, a vaccine derived from the nematode gut membrane glycoproteins. **Small Ruminant Research**, v. 151, p. 1–4, 2017.
- MEDEIROS, M. L. S. et al. Nematicidal activity of a water soluble lectin from seeds of *Moringa oleifera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 782–789, 2018.
- MEDEIROS, F. F. et al. Fontes proteicas alternativas oriundas da cadeia produtiva do biodiesel para alimentação de ruminantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 2, p. 519–526, 2015.
- MINHO, A. P. **ENDOPARASITÓSES DE OVINOS: Conhecer para Combater**. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2014. 19 p. (Circular Técnica, 45).
- MIRANDA, R. C. **Níveis de proteína e energia na dieta para redução do parasitismo gastrointestinal em ovinos artificialmente infectados**. 2018. 133f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Tocantins, Araguaína, 2018.
- MOHAMMED, H. L. Assessment of Kenaf *Hibiscus cannabinus* and *Moringa oleifera* Against *Haemonchus Contortus*. **International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology**, v. 4, n. 10, p. 36–41, 2018.
- MOLENTO, M. B. et al. ALTERNATIVAS PARA O CONTROLE DE NEMATÓIDES. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 2, p. 253–263, 2013.
- MOLENTO, M. B.; BRAZ, F. S. F. S. Ordem Strongylida. In: MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2017. cap. 25, p. 231–257.
- MOLENTO, M. B.; BUZATTI, A.; SPRENGER, L. K. Pasture larval count as a supporting method for parasite epidemiology, population dynamic and control in ruminants. **Livestock Science**, v. 192, p. 48–54, 2016.
- MORAES, G. M. D. DE et al. Potentially probiotic goat cheese produced with autochthonous adjunct culture of *Lactobacillus mucosae*: Microbiological, physicochemical and sensory attributes. **LWT-Food Science and Technology**, v. 94, n. August, p. 57–63, 2018.
- MOURA, K. S. DE et al. Coagulant Activity of Water-Soluble *Moringa oleifera* Lectin Is Linked to Lowering of Electrical Resistance and Inhibited by Monosaccharides and Magnesium Ions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, p. 1361–1371, 2016.

MOYO, B.; MASIKA, P. J.; MUCHENJE, V. Effects of supplementing cross-bred Xhosa lop eared goats with *Moringa oleifera* Lam. on helminth load and corresponding body condition score, packed cell volume. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 43, p. 5327–5335, 2013.

MUSHONGA, B. et al. Prevalence of *Haemonchus contortus* Infections in Sheep and Goats in Nyagatare District, Rwanda. **Journal of Veterinary Medicine**, p. 1-9, 2018.

MUSTAFA, M. G. et al. Techniques in Biotechnology: Essential for Industry. In: BARH, D.; AZEVEDO, V. (Eds.). **Omics Technologies and Bio-Engineering**. Cambridge: Academic Press, 2018. p. 233–249.

MUTHURAMAN, G.; SASIKALA, S. Removal of turbidity from drinking water using natural coagulants. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 1727–1731, 2014.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids**. 1.ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 2007. 384p.

NAVIE, S.; CSURHES, S. Weed risk assessment: Horseradish tree-*Moringa oleifera*. **Department of Employment, Economic Development and Innovation**, Biosecurity Queensland, 22 p., 2010.

NAWROT, R. et al. Plant antimicrobial peptides. **Folia Microbiol**, v. 59, p. 181–196, 2014.

NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K. S.; TALBOT, B. G. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. **Water Research**, v. 29, n. 2, p. 703–710, 1995.

NDABIGENGESERE, A.; SUBBA NARASIAH, K. Quality of water treated by coagulation using *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**, v. 32, n. 3, p. 781–791, 1998.

NETO, J. X. S. et al. A Chitin-binding protein purified from *Moringa oleifera* seeds presents anticandidal activity by increasing cell membrane permeability and reactive oxygen species production. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–12, 2017.

NEUHOFF, V. et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, n. 6, p. 255–262, 1988.

NIAMIR-FULLER. Towards sustainability in the extensive and intensive livestock sectors. **Revue Scientifique et Technique**, v. 35, n. 2, p. 371–387, 2016.

NORDMARK, B. A.; PRZYBYCIEN, T. M.; TILTON, R. D. Comparative coagulation performance study of *Moringa oleifera* cationic protein fractions with varying water hardness. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 4, p. 4690–4698, 2016.

OKUDA, T. et al. Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt solution. **Water Research**, v. 35, n. 2, p. 405–410, 2001.

- OLSON, M. E. Combining data from DNA sequences and morphology for a phylogeny of Moringaceae (Brassicales). **Systematic Botany**, v. 27, n. 1, p. 55–73, 2002.
- OLSON, M. E. Moringa frequently asked questions. **Acta Horticulturae**, v. 1158, p. 19–32, 2017.
- OWUSU, D.; ODURO, I.; ELLIS, W. O. Development of crackers from cassava and sweetpotato flours using *Moringa oleifera* and *Ipomoea batatas* leaves as fortificant. **American Journal of Food and Nutrition**, v. 1, n. 3, p. 114–122, 2011.
- PAIKRA, B. K.; DHONGADE, H. KUMAR J.; GIDWANI, B. Phytochemistry and Pharmacology of *Moringa oleifera* Lam. **Journal of Pharmacopuncture**, v. 20, n. 3, p. 194–200, 2017.
- PALADA, M. C. The moringa industry in the Philippines: status, challenges and opportunities. **Acta Horticulturae**, v. 1158, p. 447–454, 2017.
- PALADA, M. C. **The Miracle Tree: *Moringa oleifera***. Second ed. Iloilo, Philippines: Xlibris Corporation, 2019.
- PARROTTA, J. A. *Moringa oleifera* LAM., 1785. In: ROLOFF, A. et al. (Eds.). . Enzyklopädie der Holzgewächse: Handbuch und Atlas der Dendrologie. Weinheim: Wiley-VCH, 2014. p. 1–8
- PEREIRA, F. S. G. et al. *Moringa oleifera*: a promising agricultural crop and of social inclusion for Brazil and semi-arid regions for the production of energetic biomass (biodiesel and briquettes). **Oilseeds & fats Crops and Lipids**, v. 25, n. 1, p. 1–11, 2018.
- PEREIRA, M. L. et al. Purification of a Chitin-Binding Protein from *Moringa oleifera* Seeds with Potential to Relieve Pain and Inflammation. **Protein & Peptide Letters**, v. 18, n. 11, p. 1078–1085, 2011.
- PISSERI, F. et al. Alternative and integrative medicine sustainable animal production , systemic prevention strategies in parasitic diseases of ruminants. **Alternative and Integrative Medicine**, v. 2, n. 2, p. 106, 2013.
- R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2019. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>
- RADOVICH, T. **Farm and Forestry Production and Marketing profile for Moringa (*Moringa oleifera*)**. Specialty ed. Holualoa: Permanent Agriculture Resources (PAR), 2011.
- RIBEIRO, A. C.; GUIMARAES, P. T. G.; ALVAREZ V. V. H. (Ed.). **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais - 5a. aproximação**. Viçosa, MG: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999. 359 p
- RODRIGUES, C. F. DE C. et al. Boas práticas, gestão sanitária e bem estar animal na produção de ovinos e caprinos. **PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 6, n. 11, p. 17p, 2012.

ROEBER, F.; JEX, A. R.; GASSER, R. B. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2013.

ROGÉRIO, M. C. P. et al. **Dietas de alto concentrado para ovinos de corte: Potencialidades e limitações**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2018. 22 p. (Comunicado Técnico, 174).

ROGERS, K. **Biotechnology**. Encyclopædia Britannica, Inc. 2019. (Nota técnica). Disponível em: <<https://www.britannica.com/technology/biotechnology>>. Acesso em: 6 jan. 2020.

ROLIM, L. A. D. M. M. et al. Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. 53–58, 2011.

SALGADO, J. A. et al. Endoparasite and nutritional status of Suffolk lambs in seven production systems. **Animal Production Science**, v. 58, n. 9, p. 1667–1676, 2017.

SALGADO, J. A.; SANTOS, C. DE P. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. **Brazilian journal of veterinary parasitology**, v. 25, n. 1, p. 3–17, 2016.

SALLES, H. O. et al. Lectin, hemolysin and protease inhibitors in seed fractions with ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. **Brazilian journal of veterinary parasitology**, v. 23, p. 136–143, 2014a.

SALLES, H. O. et al. **Método para avaliar, sob condições controladas, a contaminação de forrageiras por larvas de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2014b. 7 p. (Comunicado Técnico, 139).

SALLES, H. O. et al. **Adubos minerais para uso na Econemat®**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2018. 9 p. (Comunicado Técnico, 176).

SALLES, H. O. et al. Crop residues activity against the free-living stages of small ruminant nematodes. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 28, n. 3, p. 528–532, 2019.

SALOMON, D.; SESSA, G. Biotechnological strategies for engineering plants with durable resistance to fungal and bacterial pathogens. In: ALTMAN, A.; HASEGAWA, P. M. (Eds.). **Plant Biotechnology and Agriculture**. Cambridge: Academic Press, cap. 21. 2012. p. 329–342.

SÁNCHEZ, A.; VÁZQUEZ, A. Bioactive peptides: A review. **Food Quality and Safety**, v. 1, p. 29–46, 2017.

SANTOS, A. F. S. et al. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 504–508, 2009.

SANTOS, C. A.; MOURA, F. B.; LIMA, L. N. Potencialidades e uso da moringa (*Moringa oleifera* Lam.). In: OXENTE (Ed.). **Conservação dos Recursos Naturais**. Paulo Afonso/BA: SABEH, 2016. 138 p.

SANTOS, J. M. L. et al. *Haemonchus contortus* β -tubulin isotype 1 gene F200Y and F167Y SNPs are both selected by ivermectin and oxfendazole treatments with differing impacts on anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 248, p. 90–95, 2017.

SANTOS, V. C. **Subprodutos de oleaginosas como fontes alternativas na alimentação de cordeiros em terminação**. 2011. 71f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368–379, 1987.

SENGUPTA, M. E. et al. Use of *Moringa oleifera* seed extracts to reduce helminth egg numbers and turbidity in irrigation water. **Water Research**, v. 46, n. 11, p. 3646–3656, 2012.

SEÓ, H. L. S. et al. The Effect of Gastrointestinal Nematode Infection Level on Grazing Distance from Dung. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. 1–12, 2015.

SHARMA, B. K. et al. Lubricant properties of Moringa oil using thermal and tribological techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 96, n. 3, p. 999–1008, 2009.

SHEBEK, K. et al. The Flocculating Cationic Polypeptide from *Moringa oleifera* Seeds Damages Bacterial Cell Membranes by Causing Membrane Fusion. **Langmuir**, v. 31, n. 15, p. 4496–4502, 2015.

SILVA, W. M. O. DA et al. Uso popular de plantas medicinais na promoção da saúde animal em assentamentos rurais de Seropédica – RJ. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 20, n. 1, p. 32–36, 2013.

SIVASANKARI, B.; ANANDHARA, M.; GUNASEKARAN, P. An ethnobotanical study of indigenous knowledge on medicinal plants used by the village peoples of Thoppampatti, Dindigul district, Tamilnadu, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, p. 408–423, 2014.

SOLTAN, Y. et al. **Utilization of *Moringa oleifera* in ruminant nutrition (Review article)**. 3rd. International conference “Sustainable Development of Livestock’s Production Systems”. **Anais...Egypt**: 2017.

SOLTO, J. D. S.; SOUSA, A. A. DE. **CULTIVO DA MORINGA NO NORDESTE BRASILEIRO**. In: **Potencialidades da *Moringa oleifera* Lam.** São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, 2018. 227 p.

SOUSA, A. J. S. et al. Scanning electron microscopy reveals deleterious effects of *Moringa oleifera* seed exuded proteins on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* eggs. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. In Press, 2019.

SOUSA, A. M. P. **Proteínas ovcidas de *Moringa oleifera* LAMARCK: isolamento, caracterização bioquímica e alvos de ação no modelo *Haemonchus contortus***. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

- SOUTO, P. C.; JÚNIOR, S. G. S. M. Origem, botânica e Morfologia da Moringa. In: **Potencialidades da *Moringa oleifera* Lam.** São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, cap. 1. 2018. p. 15–36.
- SULAIMAN, M. et al. *Moringa oleifera* seed as alternative natural coagulant for potential application in water treatment: A review. **Journal of Advanced Review on Scientific Research**, v. 30, n. 1, p. 1–11, 2017.
- TAM, J. P. et al. Antimicrobial peptides from plants. **Pharmaceuticals**, v. 8, n. 4, p. 711–757, 2015.
- TAYLOR, M. A. SCOPS and COWS-'worming it out of UK farmers'. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 1-2, p. 65–9, 2012.
- TAYO, G. M. et al. Anthelmintic Activity of *Moringa oleifera* Leaf Extracts Evaluated in Vitro on Four Developmental Stages of *Haemonchus contortus* from Goats. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 1702–1710, 2014.
- TORRES-ACOSTA, J. F. J.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 77, n. 2–3, p. 159–173, 2008.
- TUNGGOLOU, J.; PAYUS, C. Application of *Moringa oleifera* Plant as Water Purifier for Drinking Water Purposes. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 10, p. 268–275, 2017.
- TZOUPANOS, N.; ZOUBOULIS, A. **Coagulation–flocculation processes in water/wastewater treatment: the application of new generation of chemical reagents.** I6th IASME/WSEAS International Conference on HEAT TRANSFER, THERMAL ENGINEERING and ENVIRONMENT. **Anais...**Rhodes, Greece: 2008.
- UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes.** 4^a ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1998. 149 p.
- VALLI, M. et al. Tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? **Quimica Nova**, v. 35, n. 11, p. 2278–2287, 2012.
- VALVERDE, K. C. et al. Combined water treatment with extract of natural *Moringa oleifera* Lam and synthetic coagulant. **Revista Ambiente e Água**, v. 13, n. 3, p. 11, 2018.
- VAN SOEST, P. J. ROBERTSON, J. D.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3583– 3597, 1991.
- VAN WYK, J. A.; BATH, G. F. The FAMACHA System for Managing Haemonchosis in Sheep and Goats by Clinically Identifying Individual Animals for Treatment. **Veterinary Research**, v. 33, n. 5, p. 509–529, 2002.
- VELDE, F. VANDE; CHARLIER, J.; CLAEREBOU, E. Farmer Behavior and

Gastrointestinal Nematodes in Ruminant Livestock — Uptake of Sustainable Control Approaches. **Frontiers in Veterinary Science** |, v. 5, n. 255, p. 1-12, 2018.

VENDRUSCOLO, F.; FERREIRA, G. L. DA R.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Biosorption of hexavalent chromium by microorganisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 119, p. 87–95, 2017.

VERCRUYSSSE, J. et al. Control of helminth ruminant infections by 2030. **Parasitology**, Special Issue Review, p. 1–10, 2018.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. DA S. OS PRODUTOS NATURAIS E A QUÍMICA MEDICINAL MODERNA. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

VIEIRA, V. D. et al. Sheep gastrointestinal helminthiasis in the Sertão region of Paraíba State, Northeastern Brazil: prevalence and risk factors. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 4, p. 488–494, 2014.

VILLASEÑOR-BASULTO, D. L. et al. Wastewater treatment using *Moringa oleifera* Lam seeds: A review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 23, p. 151–164, 2018.

WALLER, P. J. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, p. 277–289, 2006.

WALTON, J. R. Chronic Aluminum Intake Causes Alzheimer's Disease: Applying Sir Austin Bradford Hill's Causality Criteria. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 40, n. 4, p. 765–838, 2014.

WAN, T.; XUE, H.; YI-PING, T. Transgenic approaches for improving use efficiency of nitrogen, phosphorus and potassium in crops. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 16, n. 12, p. 2657–2673, 2017.

WANG, C. et al. Recent Research Progress in China on *Haemonchus contortus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-11, 2017.

WEIDMANN, J.; CRAIK, D. J. Discovery, structure, function, and applications of cyclotides: Circular proteins from plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 16, p. 4801–4812, 2016.

WILMSEN, M. O. et al. Gastrointestinal nematode infections in sheep raised in Botucatu , state of São Paulo , Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 3, p. 348–354, 2014.

WINK, M. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. **Medicines**, v. 2, p. 251–286, 2015.

WOLF, A. V. . et al. New refractometric methods for determination of total proteins in serum and in urine. **Clinical Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 158–165, 1962.

WONG, K. H. et al. Ginkgotides: Proline-Rich Hevein-Like Peptides from Gymnosperm

Ginkgo biloba. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1–15, 2016.

WONG, K. H. et al. Vaccatides: Antifungal Glutamine-Rich Hevein-Like Peptides from *Vaccaria hispanica*. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–14, 2017a.

WONG, K. H. et al. β -Ginkgotides: Hyperdisulfide-constrained peptides from *Ginkgo biloba*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 6140, p. 1-13, 2017b.

WOODGATE, R. G.; LOVE, S. WormKill to WormBoss — Can we sell sustainable sheep worm control? **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 1-2, p. 51–57, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION -WHO. **Inheriting a sustainable world? Atlas on children's health and the environment**. Geneva: World Health Organization, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO/UNICEF. **Progress on Sanitation and Drinking Water: 2015 update and MDG assessment**. Geneva: UNICEF, 2015.

WU, Y.; ENGEN, J. R. What mass spectrometry can reveal about protein function. **The Analyst**, v. 129, n. 4, p. 290–296, 2004.

XIONG, D. et al. SPAD-based leaf nitrogen estimation is impacted by environmental factors and crop leaf characteristics. **Scientific reports**, v. 5, p. 1–12, 2015.

YING, H. et al. Overexpression of the *Suaeda salsa* SsNHX1 gene confers enhanced salt and drought tolerance to transgenic *Zea mays*. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 12, p. 2612–2623, 2018.

YUAN, H. et al. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. **Molecules**, v. 21, n. 559, p. 1-18, 2016.

ZAINALABIDIN, F. A. et al. The Prevalence of Parasitic Infestation of Small Ruminant Farms in Perak, Malaysia. **Tropical Life Sciences Research**, v. 26, n. 1, p. 1–8, 2015.

ZAND, A. D.; HOVEIDI, H. Comparing Aluminium Sulfate and Poly-Aluminium Chloride (PAC) Performance in Turbidity Removal from Synthetic Water. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 287–292, 2015.

ZEN, S. DE; SANTOS, M. C. DOS; MONTEIRO, C. M. Evolução da caprino e ovinocultura. 15 **Ativos da pecuária de caprino e ovinocultura**, ed. 1, p. 8–11, 2014.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO

Periódico: Journal of Proteomics

Fator de Impacto: 3,537

Qualis A1 (Biotecnologia)

Journal of Proteomics 217 (2020) 103692



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jprot

Mo-HLPs: New flocculating agents identified from *Moringa oleifera* seeds belong to the hevein-like peptide family



Ana Márjory Paiva Sousa^{a,b,*}, Hévila Oliveira Salles^b, Hermógenes David de Oliveira^c,
Beatriz Blenda Pinheiro de Souza^d, José de Lima Cardozo Filho^d, Daniel Nogoceke Sifuentes^d,
Maura Vianna Prates^d, Carlos Bloch Junior^d, Marcelo Porto Bemquerer^d, Antonio Silvio do Egito^b

^a Rede Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO, Universidade Estadual do Ceará, Campus do Itaperi, CEP: 60714-903 Fortaleza, CE, Brazil

^b Laboratório de Bioquímica, Empresa Caprinos e Ovinos, Estrada Sobral-Graças, Km 4, CP 71, CEP: 62010-970 Sobral, CE, Brazil

^c Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici Prof. Prisco Bezerra, CEP: 60440-900 Fortaleza, CE, Brazil

^d Laboratório de Espectrometria de Massa, Empresa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Esquema Biológica, CEP: 70770-901 Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Moringa oleifera
Cationic peptides
Hevein-like
Flocculant activity

ABSTRACT

Cationic peptides found in *Moringa oleifera* seeds belong to different protein families and are described as the main flocculating agents of the species. In this study we report the identification and isolation of four new flocculant peptides, called Mo-HLPs 1–4, belonging to the family of hevein-like peptides, previously only known for their members' antimicrobial activity. Purification of the peptides followed two sequential membrane ultrafiltration steps and separation by reverse-phase liquid chromatography. Proteomic analyses showed that Mo-HLPs are extremely basic ($pI > 10$) cysteine-rich molecules with molecular masses between 4.5 and 4.8 kDa and with a highly conserved chitin-binding domain. Searches in BLAST revealed high similarity of Mo-HLPs with hevein and other hevein-like peptides and 90% identity with morintides, which are members of the 8C-hevein-like subfamily found in *M. oleifera* leaves. Mo-HLPs microfloculation assays showed distinct coagulation/flocculation efficiencies, promoting turbidity reduction levels between 67 and 89% in synthetic turbid water. Activity variations were attributed to the substitution of some amino acids among the isoforms, which may have altered the final net charge of the molecules. The identification of Mo-HLPs represents the discovery of a new group of cationic peptides involved in the flocculation properties of *M. oleifera* seeds.

Significance: The study reveals the presence of hevein-like peptides in *Moringa oleifera* seeds. It is reported for the first time that members of this family have properties to act as flocculating agents of importance for water treatment processes. The identification of these peptides as well as new functional assignment broadens the horizon for speculation on new species which could act as sources of green coagulants for sustainable water treatment, and contributes to the knowledge about occurrence, distribution, molecular and active diversity of peptides belonging to the hevein-like family.

APÊNDICE B - REGISTRO DE SEQUÊNCIA EM BASE DE DADOS

Depósito da sequência fragmento de Mo-HLP3 em UniProtKB/Swiss-Prot
Código de acesso: C0HLN3

unirot.org/unirot/C0HLN3/publications

UniProtKB Advanced

BLAST Align Retrieve/ID mapping Peptide search SPARQL Help Contact

Publications related to C0HLN3 - MO3_MOROL

Display Help video Add a publication Feedback

Entry 1 to 1 of 1 Show 25

Publications

Feature viewer

Feature table

Filter by

Source

UniProtKB/Swiss-Prot (1) (reviewed)

Category

Expression (1)

1. **"Mo-HLPs: New flocculating agents identified from *Moringa oleifera* seeds belong to the hevein-like peptide family."**
 Sousa A.M., Salles H.O., Oliveira H.D., Souza B.B.P., Filho J.L.C., Sifuentes D.N., Prates M.V., Junior C.B., Bemquerer M.P., Egito A.S.
 Unpublished observations (NOV-2019)
Cited for: PROTEIN SEQUENCE, IDENTIFICATION BY MASS SPECTROMETRY, TISSUE SPECIFICITY.
Category: Expression, Sequences.
Tissue: Seed 1 Publication
Source: UniProtKB/Swiss-Prot (reviewed).

1 to 1 of 1 Show 25

We'd like to inform you that we have updated our [Privacy Notice](#) to comply with Europe's new General Data Protection Regulation (GDPR) that applies since 25 May 2018.

Scale

Ativar o Windows
 Accesse Configuracões para o Windows
 Do not show this banner again