



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**ANA MÁRJORY PAIVA SOUSA**

**PEPTÍDEOS OVICIDAS DE *Moringa oleifera* LAMARCK:  
ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ALVOS DE  
AÇÃO NO MODELO BIOLÓGICO *Haemonchus contortus***

**FORTALEZA - CEARÁ**  
**2016**

ANA MÁRJORY PAIVA SOUSA

**PEPTÍDEOS OVICIDAS DE *Moringa oleifera* LAMARCK: ISOLAMENTO,  
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ALVOS DE AÇÃO NO MODELO  
BIOLÓGICO *Haemonchus contortus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Hévila Oliveira Salles

**FORTALEZA - CEARÁ**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S696p Sousa, Ana Márjory Paiva.  
Peptídeos ovicidas de *Moringa oleifera* Lamarck : isolamento, caracterização bioquímica e alvos de ação no modelo biológico *Haemonchus contortus* / Ana Márjory Paiva Sousa. – 2016.  
97 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira.  
Coorientação: Profa. Dra. Hévila Oliveira Salles.
1. Peptídeos flocculantes. 2. *Moringa*. 3. Atividade ovicida. 4. Bionemática. I. Título.
- CDD 572
-

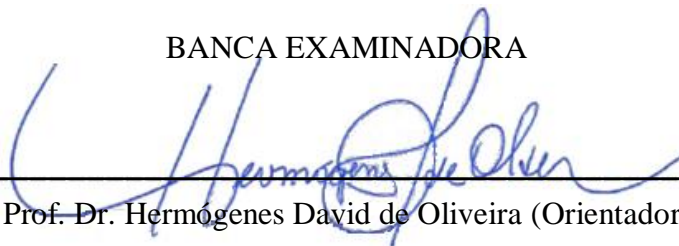
ANA MÁRJORY PAIVA SOUSA

**PEPTÍDEOS OVICIDAS DE *Moringa oleifera* LAMARCK: ISOLAMENTO,  
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ALVOS DE AÇÃO NO MODELO  
BIOLÓGICO *Haemonchus contortus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em: 22/ 02 /2016

BANCA EXAMINADORA



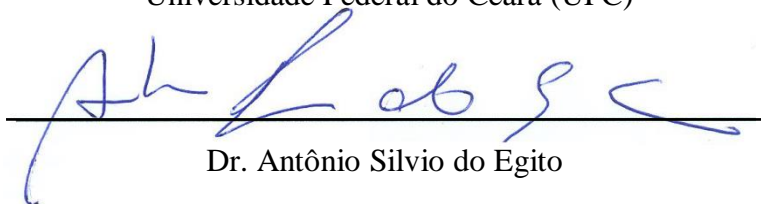
Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)



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



Prof.ª Dr.ª Ilka Maria Vasconcelos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dr. Antônio Silvío do Egito  
EMBRAPA Caprinos e Ovinos

Aos meus pais, Clerton e Doralice.

À minha avó, Laura.

Com todo amor e gratidão,

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu professor e orientador **Dr. Hermógenes David de Oliveira**, por ter me recebido em seu laboratório, por tão brilhantemente ter desempenhado o papel de orientador, pela confiança, paciência e insistência em cada etapa. O compartilhamento de suas experiências e conhecimentos me proporcionou grande amadurecimento.

À minha tão “queriiida” coorientadora, **Dr<sup>a</sup> Hévila Oliveira Salles**, pela honra de trabalhar com uma profissional tão competente e que tem imenso prazer em compartilhar todo seu conhecimento. Meu aprendizado com você vai muito além da ciência. Agradeço por desde o início ter acreditado em mim; pela generosidade, paciência, pelas conversas e conselhos constantes; pela motivação em momentos de desânimo, pelo bom humor sem igual e pelas inúmeras gargalhadas que compartilhamos, enfim, pela sua amizade.

À **Dr<sup>a</sup> Lúcia Betânia da Silva Andrade**, minha professora de graduação e responsável pela minha iniciação na área científica, a quem devo grande parte dos conhecimentos que carrego e por quem tenho enorme carinho, respeito e admiração. Seus ensinamentos, incentivo e apoio foram fundamentais.

Ao **Dr. Antônio Silvo do Egito**, por aceitar o convite para participar desta banca e pelas inúmeras contribuições ao longo deste trabalho.

Aos professores, **Ilka Vasconcelos, José Tadeu e Márcio Viana**, por serem sempre tão solícitos e terem de alguma forma contribuído para realização deste trabalho, seja pela disponibilização de tempo, reagentes ou equipamentos.

Aos amigos da família **BioAP, Dyély, Andréa, Adson, Camila, Amanda, Adriane, Acrísio, Roberta, George, Sheila, Débora** e em especial à minha amiga **Vilmara**, com quem além do aluguel dividi também inúmeras dificuldades e conquistas desde a época da graduação e agora vencemos mais uma etapa juntas.

Aos amigos “Embrapianos”, **Renata Alencar, Renato Fontenele, Regislane Ribeiro**, pela agradável companhia e por toda ajuda. Em especial à minha amiga e irmãzinha científica, **Carolina Linhares**, pela acolhida, amizade, companheirismo e por estar sempre disposta em todos os momentos que precisei da sua ajuda.

Aos laboratoristas da EMBRAPA, **Lidiane, Terezinha e João Ricardo**, por toda colaboração e conhecimentos compartilhados, pela amizade e pela agradável convivência diária.

Aos meus pais, **Clerton e Doralice**, pelo esforço incessante para cumprir da melhor maneira possível a árdua missão de criar um filho. Vocês serão sempre meus maiores exemplos de força, honestidade e determinação.

À minha avó, **Laura**, pelo amor sempre dedicado e que mesmo sem compreender o trajeto da vida acadêmica vibrou comigo a cada conquista.

Ao meu amado “namorado”, **Igor Magalhães**, que pacientemente esteve ao meu lado mesmo quando nem eu mesma me suportava. Obrigada pelo amor, companheirismo, respeito, carinho, dedicação, incentivo de sempre e por me presentear todos os dias com o mais lindo dos sorrisos e o mais aconchegante dos abraços, tornando a batalha diária da vida em momentos mais leves e felizes. Te amo.

Ao meu primo, **Renato Willian**, que me ofereceu abrigo e que tanto fez por mim nos momentos em que precisei.

À minha fiel amiga-mãe, **Valderene Gomes**, por se fazer sempre presente, pelo carinho incondicional, pelo apoio e incentivo nos estudos e na vida, pela amizade pura, sincera e pelo abraço acolhedor de mãe com o qual sempre me acolheu.

À minha querida amiga, **Deylane Teles**, que desde a graduação tornou-se para mim um grande exemplo de ser humano e de profissionalismo. Mesmo quando longe, estivemos sempre perto dividindo angústias, dificuldades, alegrias e comemorando juntas a cada conquista. Obrigada por me ensinar tanto sobre tudo, por suas palavras doces, pela confiança e por tanto carinho. Sua amizade é uma grande honra e você é um orgulho para mim.

A **todos** que não foram citados, mas que direta ou indiretamente contribuíram para concretização dessa importante fase da minha vida.

Ao apoio financeiro concedido pela **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES**.

À **EMBRAPA Caprinos e Ovinos** por conceder suas instalações, nas quais desenvolvi quase toda parte experimental deste trabalho.

A **Deus**, pelo dom da vida e por me manter forte mesmo quando acreditei não ter mais forças pra seguir.

**Muito obrigada!**

“O esforço só é expresso em recompensa,  
quando uma pessoa se recusa a desistir”.

**Napoleon Hill**



## RESUMO

*Haemonchus contortus*, principal helminto endoparasita de caprinos e ovinos, é uma espécie de alta patogenicidade que tem apresentado resistência múltipla a diversas classes de drogas anti-helmínticas. Frente à limitação de controles químicos eficazes, tem-se estimulado a busca por novas opções de tratamento. Em função de seus potenciais terapêuticos, eficiência e especificidade, os peptídeos destacam-se na área de pesquisas que visam à produção de biofármacos. Investigações de algumas espécies vegetais têm revelado interessantes potencialidades nematicidas. *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) é uma espécie vegetal conhecida por suas diferentes propriedades farmacológicas, cujos efeitos anti-helmínticos foram recentemente reportados. O objetivo do presente estudo consistiu em identificar compostos de natureza proteica presentes em sementes de moringa, ativos contra o parasita gastrointestinal *H. contortus*. Após obtenção de um extrato proteico que exibiu potente atividade ovicida ( $96 \pm 0,8\%$ ), etapas de separações por membranas (*cut off* 12 e 2 kDa) mostraram que o efeito observado era devido, exclusivamente, a moléculas de baixa massa molecular ( $< 12$  kDa), sendo essas, tanto de origem proteica como não proteica. A fração proteica dotada de atividade ovicida foi capaz de inibir em  $82 \pm 1\%$  a taxa de eclosão de ovos de *H. contortus* e apresentou-se como banda única, de massa molecular aparente de 6,5 kDa sob condições redutoras. Além da ação ovicida, os peptídeos também apresentaram forte efeito flocculante *in vitro* e foram altamente resistentes à proteólise permanecendo ativos mesmo após 24 horas de digestão com pronase E. Atuação como inibidores de proteases também foi atribuída ao acervo funcional das moléculas. Atividade antipapainásica ( $99 \pm 0,2\%$ ) e antitripsínica ( $41 \pm 11\%$ ) foram alcançadas utilizando-se 50 e 100  $\mu\text{g}$  de proteínas, respectivamente. A determinação de uma EC<sub>90</sub> para atividade flocculante (0,812  $\mu\text{g}$ ) cerca de 250 vezes menor do que a EC<sub>90</sub> para atividade ovicida (202,3  $\mu\text{g}$ ) foi um resultado relevante, uma vez que, a existência de correlação positiva entre às diferentes atividades possibilitou o uso do teste de flocculação como forma alternativa de detectar a presença dos peptídeos ovicidas ao longo das etapas de purificação. A eluição da fração ativa através de cromatografia em matriz de troca iônica permitiu a separação da mesma em moléculas distintas obtidas através de variações de gradiente iônico. Assim, a fração ativa inicial mostrou ser, na verdade, uma mistura de peptídeos com pelo menos quatro isoformas moleculares que exibiram massas semelhantes em torno de 6,5 kDa, distribuídas por SDS-PAGE, e com elevado grau de pureza detectado por HPLC. Análises espectroscópicas revelaram ainda que três das isoformas obtidas possuem espectros de CD com mínimos e máximos típicos de arranjos desordenados (70% de estruturas aleatórias), enquanto que a quarta isoforma encontrada apresentou padrão conformacional distinto, exibindo arranjos em alfa hélice como conteúdo dominante (69%), porém com ocorrência de estruturas não ordenadas bastante representativas (31%). Quanto ao modo de ação, observou-se uma significativa inversão do efeito ovicida quando o material foi ensaiado em solução cuja força iônica foi alterada para 0,15 M na presença de NaCl. A relação entre as atividades flocculantes e ovicidas foi investigada e mecanismos de interações eletrostáticas foram apontados como requisito comum ao desempenho funcional das moléculas. Os resultados aqui obtidos revelam novas e importantes aplicabilidades funcionais para um grupo de peptídeos já bastante explorado por seus efeitos flocculantes, sendo essas moléculas candidatas em potencial para atuarem no controle alternativo de helmintoses.

**Palavras-chave:** peptídeos flocculantes, moringa, atividade ovicida, bionematicida

## ABSTRACT

*Haemonchus contortus* is the most dominant endoparasite of sheep and goats, causing huge economic losses. Several anthelmintics have been used to minimize the losses caused by parasitic infection. However, anthelmintic resistance in nematodes has become a major practical problem in many countries and has stimulated the search for alternative and environmentally acceptable control methods, such as bioactive compounds from medicinal plants. The current study reports on the purification and partial characterization of bioactive peptides from *Moringa oleifera* seeds with ovicidal activity against *H. contortus*. The purification protocol entailed obtaining an aqueous extract, steps of separations by membranes (*cut off* 12 and 2 kDa) and ion exchange chromatography. The protein material obtained was subjected to egg hatch assay, flocculant activity, protease inhibition and resistance to proteolysis. Subsequent characterization was performed using SDS-PAGE electrophoresis, high performance liquid chromatography (HPLC) and circular dichroism (CD). The aqueous seed extract from *M. oleifera* seeds exhibited ovicidal effect inhibiting  $96 \pm 0.8\%$  of egg hatching rate of *H. contortus*. Anthelmintic peptides, isolated from the total aqueous extract showed  $82 \pm 1\%$  ovicidal activity (EC<sub>90</sub> of 202.3  $\mu\text{g}$ ) and presented a single band of apparent molecular mass of 6.5 kDa under reducing conditions. Furthermore, they showed *in vitro* flocculant effect (EC<sub>90</sub> of 0.812  $\mu\text{g}$ ), trypsin inhibitor activity ( $41 \pm 11\%$ ), papain inhibitor activity ( $99 \pm 0.2\%$ ) and were highly resistant to proteolysis, remaining active even after 24 hours of incubation with pronase E. The peptides were adsorbed on cationic resin and separated in least four isoforms of similar molecular masses (6.5 kDa) distributed by SDS-PAGE, and high purity detected by HPLC. Circular dichroism analysis revealed that three of the isoforms have content of 70% random coil structures, while the fourth isoform found showed  $\alpha$ -helix rich structures (69%). Finally, studies involving changes in ionic strength of the medium indicated that electrostatic interactions may be a common mechanism between flocculant and ovicidal activity of the peptides. The results obtained demonstrated the discovery of peptides from *M. oleifera* with important anthelmintic properties and suggest an affordable and sustainable option for alternative parasite control.

**Keywords:** flocculants peptides, moringa, ovicidal activity, bionematicide

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Ciclo evolutivo do endoparasita gastrointestinal <i>Haemonchus contortus</i> . ....	22
<b>Figura 2</b> - Estrutura geral e diferentes partes de <i>Moringa oleifera</i> Lam.....	27
<b>Figura 3</b> - Esquema de obtenção das frações proteicas das sementes de moringa. ....	38
<b>Figura 4</b> - Ovos e larvas de primeiro estágio (L1) de <i>H. contortus</i> visualizados durante a contagem das placas.....	43
<b>Figura 5</b> - Efeito de frações de sementes de <i>M. oleifera</i> Lam. sobre a taxa de eclosão de ovos de <i>H. contortus</i> .....	48
<b>Figura 6</b> - Perfil eletroforético de frações proteicas ovicidas presentes em sementes de <i>M. oleifera</i> Lam. ....	49
<b>Figura 7</b> - Perfil cromatográfico (HPLC) de frações proteicas obtidas por diálises a partir do extrato aquoso das sementes de <i>M. oleifera</i> Lam. ....	50
<b>Figura 8</b> - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de tricina (Tricina-SDS-PAGE) da fração proteica D2 sob condições reduzidas e não reduzida com ditioneitol (DTT).....	52
<b>Figura 9</b> - Análises densitométricas e perfis cromatográficos (HPLC) obtidos da fração proteica D2 sob condições reduzidas e não reduzida com ditioneitol (DTT).....	53
<b>Figura 10</b> - Atividade floculante da fração proteica D2 de <i>M. oleifera</i> Lam. ....	56
<b>Figura 11</b> - Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE 12,5%) de D2 e BSA antes e após ensaio de digestibilidade <i>in vitro</i> com pronase E. ....	58
<b>Figura 12</b> - Análises densitométricas dos perfis eletroforéticos de D2 antes e após ensaio de digestibilidade <i>in vitro</i> .....	58
<b>Figura 13</b> - Perfis cromatográficos (HPLC) obtidos da fração proteica D2 de <i>M. oleifera</i> Lam. antes e após ensaio de digestibilidade <i>in vitro</i> .....	59
<b>Figura 14</b> - Atividade floculante da fração proteica D2 de <i>M. oleifera</i> Lam. antes e após ensaio de digestibilidade <i>in vitro</i> . ....	61
<b>Figura 15</b> - Perfil cromatográfico da fração proteica D2 de <i>M. oleifera</i> Lam. em matriz de troca iônica (Source 30S). ....	62
<b>Figura 16</b> - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de tricina (Tricina-SDS-PAGE) dos picos resolvidos em matriz de troca iônica (Source 30S).....	63
<b>Figura 17</b> - Perfis cromatográficos (HPLC) dos diferentes picos proteicos obtidos em cromatografia de troca iônica. ....	64
<b>Figura 18</b> - Efeito dos picos proteicos obtidos em cromatografia de troca iônica (Source 30S) sobre a taxa de eclosão de ovos de <i>H. contortus</i> . ....	66

<b>Figura 19</b> - Atividade flocculante dos picos proteicos obtidos em cromatografia de troca iônica (Source 30S). .....	67
<b>Figura 20</b> - Espectros de dicroísmo circular dos diferentes picos proteicos obtidos em cromatografia de troca iônica (Source 30S). .....	69
<b>Figura 21</b> - Cromatograma de afinidade da fração D2 de <i>M. oleifera</i> Lam.em matriz de quitina.....	71
<b>Figura 22</b> - Efeito dos picos obtidos em cromatografia de afinidade à quitina sobre a taxa de eclosão de ovos de <i>H. contortus</i> . .....	71
<b>Figura 23</b> - Efeito de diferentes concentrações de sulfato de alumínio sobre a taxa de eclosão de ovos de <i>H. contortus</i> .....	73
<b>Figura 24</b> - Efeito inibidor da eclosão por D2 e sulfato de alumínio na presença de cloreto de sódio. ....	74

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Conteúdo proteico de frações obtidas a partir das sementes de <i>M. oleifera</i> Lam.	48
<b>Tabela 2</b> - Efeito da fração proteica D2 de <i>M. oleifera</i> Lam. sobre a atividade enzimática da tripsina e papaína. ....	57
<b>Tabela 3</b> - Determinação da concentração efetiva de 50% (EC50) e 90% (EC90) para as atividades floculante e ovicida da fração proteica D2 de <i>M. oleifera</i> Lam.....	60
<b>Tabela 4</b> - Rendimento parcial de proteínas floculantes/ovicidas obtidas durante o processo de purificação. ....	67
<b>Tabela 5</b> - Elementos de estrutura secundária, estimados a partir de espectros de CD, dos diferentes picos proteicos obtidos em cromatografia de troca iônica (Source 30S). ....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BANA	<i>N</i> - $\alpha$ -benzoil-DL-arginina-p-naftilamida
BApNA	<i>N</i> - $\alpha$ - benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
BSA	Albumina sérica bovina
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CD	Dicroísmo circular
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DMACA	4-(Dimethylamino)-cinnamaldehyde solution
DTT	Ditiotreitol
D>12	Fração retida em membrana de diálise <i>cut off</i> 12 kDa
D12	Fração não retida em membrana de diálise <i>cut off</i> 12 kDa
D2	Fração retida em membrana de diálise <i>cut off</i> 2 kDa
D<2	Fração não retida em membrana de diálise <i>cut off</i> 2 kDa
EA	Extrato aquoso
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
kDa	Kilodaltons
mAU	Mili unidades de absorbância
mgP/gF	Miligrama de proteína por grama de farinha
NaCl	Cloreto de sódio
NGI	Nematodioses gastrintestinais
OD <sub>500</sub>	Densidade óptica a 500 nm
PNR	Pico não retido
P50	Pico retido eluído com 50 mM de NaCl
P100	Pico retido eluído com 100 mM de NaCl
P200	Pico retido eluído com 200 mM de NaCl
P500	Pico retido eluído com 500 mM de NaCl
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> , - tetrametiletenodiamino
UI	Unidade de inibição

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Caracterização do problema e justificativa.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	19
2.1 Produção de pequenos ruminantes no Brasil .....	20
2.1.1 <i>Nematodioses Gastrintestinais – NGI</i> .....	21
2.2 Uso de plantas no controle alternativo de helmintoses .....	25
2.3 <i>Moringa oleifera</i> Lamarck .....	27
2.3.1 <i>Usos tradicionais de Moringa oleifera</i> Lam. ....	28
2.4 Potencial biotecnológico de peptídeos vegetais.....	30
3 OBJETIVOS .....	33
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos .....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
4.1 Sementes de moringa.....	36
4.2 Ovos de helmintos .....	36
4.3 Enzimas .....	36
4.4 Reagentes químicos e outros materiais.....	37
4.5 Obtenção do extrato aquoso de sementes de <i>M. oleifera</i> Lam. e fracionamento de proteínas totais por membranas.....	37
4.6 Determinação de proteínas totais .....	39
4.7 Análises eletroforéticas .....	39
4.7.1 <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)</i> .....	39
4.7.2 <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de tricina (Tricina-SDS-PAGE)</i> .....	39
4.8 Detecção de proteínas bioativas em D2 .....	40
4.8.1 <i>Atividade inibitória da papaína</i> .....	40
4.8.2 <i>Atividade inibitória da tripsina</i> .....	41
4.8.3 <i>Testes de capacidade floculante</i> .....	41
4.9 Resistência à proteólise com pronase E .....	42
4.10 Efeito de D2 sobre a eclosão de ovos de <i>H. contortus</i> (COLES et. al., 1992). ....	42
4.11 Obtenção do perfil cromatográfico de D2 em HPLC.....	44
4.12 Cromatografia de troca iônica .....	44

4.13 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD) dos picos obtidos na cromatografia de troca iônica .....	44
4.14 Estudo do modo de ação do efeito ovicida de D2.....	45
4.15 Análise estatística .....	45
5 RESULTADOS .....	46
5.1 Obtenção de fração proteica ovicida em sementes de moringa .....	47
5.2 Análises eletroforéticas e perfis cromatográficos em HPLC .....	49
5.2.1 Associações em complexos proteicos .....	51
5.3 Detecção de proteínas bioativas em D2 .....	55
5.3.1 Atividade floculante .....	55
5.3.2 Atividade inibitória de proteases .....	57
5.4 Avaliação da estabilidade proteolítica de D2 .....	57
5.5 Cromatografia de troca iônica .....	61
5.6 Análises espectroscópicas por dicroísmo circular – CD .....	68
5.7 Estudo do modo de ação do efeito ovicida de D2 .....	70
7 DISCUSSÃO .....	75
8 CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS.....	86
APÊNDICE A – SUBMISSÃO DO MANUSCRITO.....	96



# **1 INTRODUÇÃO**

## 1.1 Caracterização do problema e justificativa

O Brasil é considerado um país industrializado onde a pecuária destaca-se como atividade econômica de grande relevância. Nas últimas décadas, o cenário dos sistemas produtivos brasileiros tem sofrido importantes transformações considerando, principalmente, o notório crescimento da ovinocaprinocultura. A região Nordeste destaca-se como uma das mais antigas e tradicionais na criação de pequenos ruminantes no país, sendo detentora de mais de 90% do rebanho caprino e quase 60% do rebanho ovino nacional (ZEN; SANTOS; MONTEIRO, 2014).

Embora bastante representativos, os rebanhos nordestinos ainda apresentam baixos índices de produtividade, sendo o desenvolvimento da ovinocaprinocultura fortemente ameaçado por diversos fatores, dentre os quais, problemas de ordem sanitária, que configuram como a principal limitação (COELHO et al., 2011). Infecções causadas por nematoides gastrintestinais (NGI) representam o maior desafio ao sucesso produtivo do setor agropecuário de pequenos ruminantes (SADDIQI et al., 2012).

A Hemoncose é uma das NGI distribuídas mundialmente e mais difíceis de controlar. É uma doença que afeta ruminantes, sendo caprinos e ovinos os mais susceptíveis (CLIMENI et al., 2008). Causada pelo endoparasita abomasal, *Haemonchus contortus*, a infecção está associada a sérios comprometimentos à saúde e bem estar do rebanho resultando em considerável redução do potencial produtivo dos animais, restringindo assim, o aproveitamento econômico dos mesmos (FONSECA et al., 2011). Extremamente patogênico, *H. contortus*, é a espécie dominante entre as populações encontradas em animais portadores de infecções parasitárias (ENDO et al., 2014).

A fim de controlar e reduzir as enormes perdas causadas pelas verminoses, produtores são orientados a realizar vermifugações periódicas no rebanho, havendo alterações do princípio ativo a cada ano (MOLENTO, 2004a). Nesse contexto, o mercado farmacêutico veterinário brasileiro tem se mostrado crescente e atingiu a marca de faturamento de cerca de R\$ 4,4 milhões em 2014, sendo os produtos antiparasitários considerados como a segunda classe terapêutica mais importante, com participação de 22% no mercado nacional. Fármacos destinados a espécies de ruminantes representaram 55,6% do total faturado no ano (COINF apud SINDAN, 2014). Porém, a intensa e errônea utilização de químicos sintéticos como estratégia de controle parasitário trouxe como principal consequência o desenvolvimento de cepas resistentes à maioria das drogas anti-helmínticas disponíveis no mercado. Além disso, essa prática é ainda responsável por promover aumento nos custos de produção, acelerar a

1 necessidade do desenvolvimento e comercialização de novas drogas e ainda ampliar as  
2 preocupações com a segurança humana e ambiental em virtude dos resíduos químicos gerados  
3 (COSTA; SIMÕES; RIET-CORREA, 2009; TORRES-ACOSTA et al., 2012; CASELANI,  
4 2014; PACHECO-SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014).

5 Frente a todos esses obstáculos e priorizando aspectos tanto econômicos quanto  
6 ambientais, a procura por estratégias alternativas de controle parasitário tem motivado  
7 inúmeras pesquisas. Amplamente difundido, o estudo de plantas com propriedades medicinais  
8 e a busca por moléculas naturais capazes de promover efeitos deletérios sobre patógenos  
9 despontam como amplo e promissor campo de investigações. Diversos estudos *in vitro* e *in*  
10 *vivo* têm relatado espécies vegetais com potenciais efeitos anti-helmínticos (NERY;  
11 DUARTE; MARTINS, 2009; SOUSA et al., 2013). Na maioria dos casos, os compostos  
12 implicados com a ação nematicida pertencem a uma ampla classe de substâncias químicas  
13 denominadas de metabólitos secundários, que podem ser produzidos em diferentes órgãos da  
14 planta (LUZ, 2009). Dentre os metabólitos sugeridos como agentes anti-helmínticos  
15 destacam-se saponinas, alcaloides, glicosídeos, flavonoides, lignina e taninos, sendo estes  
16 últimos os mais reportados (HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2011).

17 Além de compostos do metabolismo secundário, proteínas representam um extenso  
18 grupo de moléculas reconhecido por desempenhar importantes papéis defensivos, dentre as  
19 quais podemos destacar: lectinas, inibidores de proteases, peroxidases e proteínas  
20 relacionadas à patogênese (RP) (PINTO; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2011). Algumas dessas  
21 proteínas são capazes de afetar negativamente o desenvolvimento de espécies nematoides.  
22 Ríos-de Álvarez et al. (2012) mostraram a atuação direta e indireta de lectinas sobre os  
23 parasitas gastrintestinais *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus colubriformis*, sendo  
24 descritas alterações na fecundidade dos vermes e ativação de resposta imune local do  
25 hospedeiro. Lectinas podem ainda atuar como inativadoras de ribossomos (RIP's)  
26 promovendo efeitos deletérios por interrupção da síntese proteica. Proteases cisteínicas  
27 também são apontadas como fortes candidatas ao controle de NGI por ocasionar digestão da  
28 cutícula dos nematódeos (STEPEK et al., 2004; DOMINGUES et al., 2013).

29 *Moringa oleifera* Lam. (moringa), pertencente ao único gênero da família  
30 Moringaceae, é uma espécie vegetal de grande importância social e econômica e uma das  
31 plantas mais estudadas e utilizadas. Destaca-se, principalmente, por sua grande contribuição  
32 em compostos bioativos com diferentes propriedades farmacológicas. O uso da espécie vai  
33 desde aplicações na medicina, sendo também utilizada para fins alimentares devido ao alto  
34 valor nutricional, bastante empregada no tratamento de águas para consumo em virtude da

1 presença de lectinas e proteínas flocculantes em suas sementes, sendo ainda de grande  
2 relevância na produção de biodiesel (GASSENSCHMIDT et al., 1995; SANTOS et al., 2009;  
3 ARAÚJO et al., 2013; MOYO; MASIKA; MUCHENJE, 2014; LEONE et al., 2015).  
4 Metabólitos secundários presentes nas folhas de *Moringa oleifera* Lam. foram sugeridos  
5 como responsáveis pelas propriedades anti-helmínticas encontradas na espécie. Diferentes  
6 compostos incluindo saponinas, alcaloides, taninos e flavonoides foram mencionados como  
7 agentes ovicidas e larvicidas contra *H. contortus* (TAYO et al., 2014).

8         Recentemente, Salles et al. (2014) avaliando as potencialidades nematicidas de  
9 diferentes espécies vegetais, sugeriram, pela primeira vez, que moléculas proteicas de baixa  
10 massa poderiam estar relacionadas com propriedades ovicidas exibidas pelas sementes de  
11 *Moringa oleifera* Lam. Uma vez que a descoberta de novos princípios ativos viria a contribuir  
12 consideravelmente para ampliação de alternativas ao controle químico parasitário, este estudo  
13 se propôs a isolar possíveis proteínas associadas aos efeitos previamente observados por  
14 Salles et al. (2014), bem como realizar análises bioquímicas e estruturais visando  
15 compreender prováveis modos de ação de tais moléculas.

16         Alguns questionamentos de partida foram essenciais para o delineamento das  
17 estratégias experimentais a serem utilizadas:

- 18
- 19         ✓ A atividade ovicida, já demonstrada pelas sementes de moringa, estaria associada a  
20         uma única classe de compostos?
  - 21
  - 22         ✓ Os efeitos seriam dependentes da interação entre compostos de naturezas distintas?
  - 23
  - 24         ✓ A caracterização bioquímica de possíveis proteínas ativas forneceria informações  
25         acerca do modo de ação dessas moléculas?
  - 26
  - 27         ✓ Além da ação ovicida, haveria alguma correlação funcional dessas proteínas com  
28         outras atividades já descritas para espécie em estudo?
  - 29
  - 30         ✓ A caracterização estrutural das moléculas ajudaria na compreensão de suas  
31         potencialidades anti-helmínticas?

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

## 2.1 Produção de pequenos ruminantes no Brasil

O sistema produtivo de pequenos ruminantes, especialmente caprinos e ovinos, é uma atividade agropecuária desenvolvida em todos os continentes. Porém, apenas em alguns países pode ser considerada como atividade de expressiva relevância econômica (MDIC, 2010).

No Brasil, a exploração desses animais iniciou-se ainda no período da colonização e até hoje é desenvolvida em quase todo o país. Em nível mundial, o Brasil ocupa a 18ª posição do ranking, com mais de 26 milhões de cabeças de caprinos e ovinos (IBGE, 2014). Nos últimos anos, a crescente consolidação da ovinocaprinocultura como atividade socioeconômica vem se constituindo em promessa para o agronegócio brasileiro contribuindo significativamente para expansão dos mercados interno e externo. O rebanho nacional concentra-se, especialmente, nas regiões Sul e Nordeste, com destaque para última, que dispende 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).

A ovinocaprinocultura no semiárido Nordestino destina-se basicamente à produção de carne e pele para suprimento do mercado local, atuando como fonte de renda e desempenhando importante papel social de subsistência familiar. Embora tradicional, a atividade na região não dispõe dos investimentos necessários que viabilizem o beneficiamento e a comercialização dos animais e de seus produtos. Com a exploração dos rebanhos sendo conduzida predominantemente de forma extensiva, o Nordeste apesar de sua potencialidade ainda apresenta um sistema de baixa produtividade e pouca influência econômica. (FIGUEREDO JÚNIOR et al., 2009; PORTO; SALUM; ALVES, 2013).

Uma vez que a saúde e o bem estar dos animais estão diretamente relacionados à rentabilidade do processo, tem-se considerado que o manejo alimentar inadequado e más condições sanitárias são os principais fatores responsáveis pelos impactos negativos atribuídos ao setor produtivo de pequenos ruminantes (COELHO et al., 2011; SANTOS; ALFARO; FIGUEIREDO, 2011; SILVA, 2014).

A enorme variedade de agentes patogênicos e a vulnerabilidade dos animais as inúmeras doenças tem acarretado perdas devastadoras para os produtores dificultando consideravelmente o aproveitamento e o sucesso da produção. Em virtude das consequências diretas (perda de peso, morte) e indiretas (custos com tratamentos, controle e prevenção), as parasitoses são apontadas como foco central dos prejuízos econômicos (GOUVEIA; GUIMARÃES, 2013; PORTO; SALUM; ALVES, 2013).

1 Doenças parasitárias gastrintestinais causadas por nematoides têm sido apontadas  
2 como a maior causa de mortalidade dos rebanhos. Animais apresentando altos níveis de  
3 infecções podem apresentar graves lesões de tecidos ou obstruções de órgãos  
4 (VILLARROEL, 2013).

### 6 **2.1.1 Nematodioses Gastrintestinais – NGI**

8 Parasitas compreendidos no filo Nematoda são de particular importância para  
9 ovinocaprinocultura, uma vez que desencadeiam uma série de doenças gastrintestinais. Os  
10 vermes podem ser encontrados no abomaso (*Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp. e  
11 *Trichostrongylus axei* ), intestino delgado (*Trichostrongylus colubriformes*, *Cooperia* spp.,  
12 *Bunostomum* spp., *Strongyloides* spp. e *Nematodirus* spp.) e intestino grosso  
13 (*Oesophagostomum* spp. e *Trichuris* spp.) dos animais (NEVES; VIEIRA; ANDRIOL, 2008).

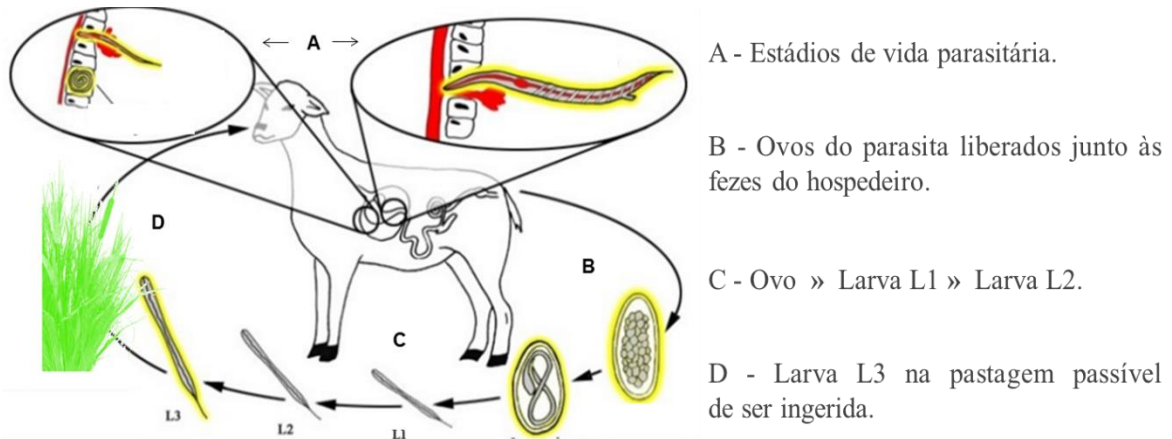
14 O desempenho produtivo dos rebanhos pode ser drasticamente afetado em  
15 consequência do parasitismo. Intensidade de infecção, espécies de parasitas presentes, idade,  
16 estado fisiológico e nutricional do hospedeiro, estão entre os fatores que mais impactam na  
17 produção (VIEIRA, 2005).

18 Estudos mostram que quase 100% dos ruminantes domésticos são acometidos por pelo  
19 menos uma espécie de endoparasitas. De modo geral, as infecções gastrintestinais que  
20 acometem os rebanhos brasileiros são do tipo mista, onde há a prevalência de três espécies de  
21 helmintos: *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformes* e *Oesophagostomum*  
22 *columbianum* (AHID et al., 2008; COSTA; SIMÕES; RIET-CORREA, 2011; ENDO et al.,  
23 2014).

24 *Haemonchus contortus* é o endoparasita de maior importância para  
25 ovinocaprinocultura e responsável por sérios prejuízos econômicos. O parasita possui ciclo  
26 evolutivo direto e dividido em fase pré-parasitária, com formas de vida livre e, fase parasitária  
27 dentro do hospedeiro (**Figura 1**). No abomaso, cada fêmea adulta chega a produzir de 5.000 a  
28 10.000 ovos por dia que são liberados no ambiente juntamente com as fezes do hospedeiro.  
29 Em condições favoráveis de temperatura e umidade (18 a 30 °C e umidade entre 80 e 100%)  
30 os ovos irão eclodir dando origem a larvas de primeiro estágio (L1) que após mais duas  
31 mudas originam L2 e L3, respectivamente. As larvas de terceiro estágio (L3) são  
32 denominadas infectantes e ao serem ingeridas junto com a pastagem iniciam o período  
33 parasitário. Ao atingir o rúmen, a bainha protetora que reveste L3 é perdida e a larva segue,  
34 então, rumo ao abomaso onde irá evoluir até a forma adulta. Durante toda sua vida parasitária,

- 1 *H. contortus* alimenta-se de sangue (AMARANTE; SALES, 2007; TAYLOR; COOP;  
2 WALL, 2010).

**Figura 1** - Ciclo evolutivo do endoparasita gastrointestinal *Haemonchus contortus*.



Fonte: Adaptado de <http://cal.vet.upenn.edu/parasitc/haemonc/>

3 Exibindo elevada intensidade de infecção nos rebanhos, *H. contortus* é o parasita mais  
4 prevalente, respondendo por até 100% da carga parasitária de um animal (WILMSEN, 2014).  
5 Extremamente patogênico e de hábitos essencialmente hematofágicos é responsável pelo  
6 desencadeamento da nematodiose gastrointestinal denominada Hemoncose. Esta verminose  
7 diminui em demasia o potencial produtivo dos animais, em especial pela dificuldade de  
8 controle da população de parasitas. O principal sintoma constitui-se em severos quadros de  
9 anemia, onde é possível verificar-se palidez acentuada de mucosas e músculos (fase aguda da  
10 doença), além de edemas subcutâneos (inflamação de aspecto mole como uma bolsa de água  
11 sob a pele) geralmente na região submandibular, edemas de cavidades (hidrotórax e  
12 hidroperitônio), hiperemia da mucosa do abomaso, perda de peso, pelos arrepiados e sem  
13 brilho (FONSECA et al., 2011; ENDO et al., 2014).

14 Na tentativa de reduzir as enormes perdas advindas do estabelecimento de verminoses  
15 gastrintestinais os produtores têm contado, há décadas, com a utilização quase que exclusiva  
16 de drogas químicas sintéticas como a principal ferramenta de controle parasitário (SADDIQI  
17 et al., 2012). Obviamente, no início os anti-helmínticos pertencentes a diferentes grupos  
18 químicos foram responsáveis pelo aumento significativo na produtividade dos rebanhos  
19 (AMARANTE; SALES, 2007). Porém, ao longo dos anos foi tornando-se cada vez mais  
20 notável a perda de eficiência, antes observada, para tal método.



1           Considerando que apenas 5% dos parasitas vivos estejam localizados dentro dos  
2 hospedeiros e o restante (95%) encontra-se nas pastagens, compreender a dinâmica  
3 populacional dos parasitas no hospedeiro e no ambiente é fundamental, uma vez que, os  
4 objetivos centrais das estratégias de controle consistem em reduzir os níveis de infecção nos  
5 animais e eliminar as larvas infectantes do ambiente, tendo em vista que os animais tratados  
6 podem ser expostos, novamente, a uma reinfecção em pouco tempo (TORRES-ACOSTA;  
7 HOSTE, 2008; BOWMAN et al., 2009).

8           Baseado em estudos epidemiológicos, vários programas de controle parasitário foram  
9 sugeridos. No início, o esquema de controle estratégico foi o mais recomendado para região  
10 nordeste do Brasil, consistindo na aplicação de quatro doses anuais de anti-helmínticos no  
11 rebanho, sendo três no período seco (quando as condições climáticas da região são  
12 desfavoráveis ao desenvolvimento e sobrevivência dos estágios de vida livre no ambiente) e  
13 uma no período chuvoso (VIEIRA et al., 1997). Embora eficiente tal método contribuiu  
14 largamente para o surgimento de resistência. Atualmente, o tratamento seletivo é o mais  
15 indicado e evita que animais saudáveis sejam medicados desnecessariamente (MINHO,  
16 2014). Análises específicas e combinações de diferentes práticas de manejo também eram  
17 indicadas para que o sucesso dos programas de controle fosse atingido (MOLENTO, 2004).  
18 No entanto, o uso intensivo das drogas anti-helmínticas aliado a falta de informações  
19 adequadas acerca de suas corretas administrações, logo resultou em programas de controle  
20 fracassados. Deste modo, o uso indiscriminado teve como principal consequência o  
21 desenvolvimento de populações de helmintos com resistência a diferentes grupos químicos.  
22 Assim, desde os primeiros registros na década de 60 até os dias de hoje, a resistência anti-  
23 helmíntica vem revelando-se um grave problema de proporções mundiais (AMARANTE;  
24 SALES, 2007; TORRES-ACOSTA et al., 2012; BICHUETTE et al., 2015).

25           Com relatos cada vez mais constantes, os índices atuais de resistência às drogas  
26 disponíveis no mercado, pelas diferentes espécies de parasitas, têm mostrado resultados  
27 alarmantes. Da Cruz et al. (2010), avaliando a eficácia de diferentes drogas no controle de  
28 verminoses em ovinos das regiões Norte e Nordeste do Rio de Janeiro, mostraram que a  
29 redução da contagem de ovos de parasitas nas fezes dos animais variou bastante em função  
30 dos agentes anti-helmínticos utilizados. Levamisol e moxidectina foram eficientes em 70% e  
31 60% das propriedades avaliadas, respectivamente. As drogas com menores taxas de eficácia  
32 foram: nitroxinil (33%), doramectina (30%), closantel, fenbendazole, ivermectina (20%) e  
33 albendazol (11%). Bichuette et al. (2015), avaliando a susceptibilidade de diferentes espécies  
34 de helmintos, previamente identificadas, à exposição de formulações distintas e combinadas

1 revelaram que *H. contortus* foi a única espécie a apresentar resistência à moxidectina, além de  
2 serem registradas ainda resistência para triclorfon e para formulação combinada de  
3 albendazol, levamisol e ivermectina. Portanto, o parasita mais prevalente é também o mais  
4 resistente.

5 Associado aos inúmeros casos de resistência, o controle à base de anti-helmínticos  
6 ainda traz consigo uma série de desvantagens como o aumento dos custos na produção,  
7 proveniente da aquisição de fármacos, bem como prejuízos ligados à saúde e meio ambiente,  
8 decorrentes da grande proporção de resíduos químicos gerados (SCZESNY-MORAES et al.,  
9 2010; CASELANI, 2014). Dessa forma, modelos de produções mais sustentáveis surgiram  
10 como demandas imperativas de uma sociedade que busca cada vez mais por produtos de  
11 qualidade, saudáveis do ponto de vista sanitário e com preços acessíveis.

12 Diante da realidade apresentada e da necessidade emergente de estratégias de controle  
13 eficazes, inúmeras pesquisas estão sendo realizadas visando o desenvolvimento de  
14 alternativas agropecuárias viáveis para o crescimento econômico da ovinocaprinocultura com  
15 o mínimo de impactos negativos possíveis. Dentre as alternativas propostas destacam-se  
16 aquelas que buscam promover a descontaminação do ambiente por eliminação das larvas  
17 infectantes do campo. Nesse sentido, agentes biológicos, tais como alguns fungos  
18 nematófagos têm mostrado resultados satisfatórios (ARAÚJO et al., 2007). Outro foco  
19 apontado refere-se aos princípios de seleção genética visando melhorar a resposta do  
20 hospedeiro contra as infecções através de cruzamentos entre raças ou indivíduos resistentes e  
21 suscetíveis (SILVA, 2010). Tem-se ainda uma abordagem que responde por grandes  
22 quantidades de estudos, sendo umas das mais antigas e talvez mais utilizadas, que se baseia no  
23 emprego de anti-helmínticos naturais, geralmente compostos de origem vegetal. Diversas  
24 espécies vegetais têm demonstrado abrigar agentes capazes de causar algum efeito negativo  
25 sobre a biologia dos parasitas provocando, assim, alterações em seu ciclo de vida. Esses  
26 efeitos têm sido associados, predominantemente, a metabólitos secundários que têm fortes  
27 papéis ecológicos desempenhando mecanismos de proteção na planta. Taninos condensados  
28 são os mais estudados (HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2011). Contudo, a integração de  
29 diferentes estratégias de controle parece ser o caminho mais equilibrado para que a  
30 ovinocaprinocultura alcance níveis ótimos de produção atendendo, assim, expectativas  
31 existentes de torná-la uma atividade expressiva economicamente e competitiva no mercado.

## 2.2 Uso de plantas no controle alternativo de helmintoses

Tradicional e importantes recursos medicinais, as plantas dispõem de um grande arsenal de compostos ativos capazes de mediar o processo saúde/doença. Em virtude da precariedade dos serviços de saúde, em muitos lugares essa é única opção terapêutica disponível tanto para humanos quanto para animais (OLIVEIRA, 2013; SILVA et al., 2013).

Na medicina veterinária, diferentemente da medicina humana, estudos envolvendo o controle de doenças à base de produtos vegetais são bem mais modestos (VIEIRA, 2005).

No entanto, suportados por problemas recorrentes com tratamentos químicos convencionais e apelo mercadológico por produção mais sustentável, o interesse na área de medicina etnoveterinária tem-se mostrado crescente e vem garantindo lugar de destaque no panorama científico (MONTEIRO; BEVILAQUA; CAMURÇA-VASCONCELOS, 2011). Práticas etnoveterinárias, quando testadas e comprovadas cientificamente podem oferecer respostas para tais problemas encontrados atualmente (OLIVEIRA, 2013). Neste cenário, a ovinocaprinocultura aparece como um importante foco de pesquisa. O elevado grau de resistência anti-helmíntica, insumos químicos de alto custo, limitação da disponibilidade de novas drogas pela indústria farmacêutica, demanda por produtos livres de resíduos químicos e a busca por sistemas agroecológicos de produção estão entre os principais fatores que impulsionam novas investigações que, de maneira geral, visam à recomendação de programas de controle parasitário alternativos, naturais, saudáveis e eficazes.

Na literatura é possível encontrarmos inúmeros relatos de extratos oriundos de diferentes espécies vegetais que são avaliadas quanto suas propriedades anti-helmínticas. A maioria desses estudos investiga a ocorrência de efeitos deletérios às formas de vida livre dos parasitas (ovos e larvas) através de testes *in vitro* de inibição da eclodibilidade e do desenvolvimento larval.

Em estudos com o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae) observou-se potentes atividades inibitórias sobre ovos (99,3%) e larvas (98,7%) de *H. contortus*. Nenhuma etapa de purificação foi efetuada, porém a análise química do material, feita através de cromatografia gasosa, detectou como principal componente o monoterpeneo 1,8-cineol, (MACEDO et al., 2009).

Redução efetiva no número de larvas totais de nematoides gastrintestinais de caprinos e ovinos foi alcançada com a utilização do óleo da semente de andiroba - *Carapa guianensis* (Meliaceae). Contudo, o estudo não identificou quais possíveis substâncias poderiam ser responsáveis pelo efeito (FARIAS et al., 2010).

1 Extratos aquosos, etanólicos e clorofórmicos das folhas de *Melastoma malabatricum*  
2 (Melastomataceae) apresentaram efeitos ovicidas e larvicidas concentração-dependente sobre  
3 *H. contortus*. Também pôde ser observado que o extrato aquoso foi capaz de exercer efeitos  
4 na motilidade de vermes adultos em apenas 2 horas de exposição (SUTEKY; DWATMADJI,  
5 2011).

6 Dentre os poucos estudos relacionando atividade anti-helmíntica com compostos de  
7 natureza proteica está o de Domingues et al. (2013) que, avaliando o efeito de extratos de  
8 *Ananas comosus* (Bromeliaceae) e da enzima bromelina, também sobre *H. contortus*,  
9 detectaram fortes efeitos ovicidas e larvicidas em testes *in vitro*, no entanto, a ação foi  
10 drasticamente reduzida quando submetidos aos testes *in vivo*.

11 Além de enzimas, peptídeos pertencentes à família dos ciclotídeos, descobertos  
12 inicialmente em plantas das famílias Violaceae e Rubiaceae, demonstraram interessantes  
13 atividades anti-helmínticas contra os nematoides gastrintestinais *Haemonchus contortus* e  
14 *Trichostrongylus colubriformis*. Embora baixos níveis de efeitos ovicidas tenham sido  
15 detectados, as moléculas apresentaram potente inibição do desenvolvimento larvar e  
16 letalidade aos parasitas adultos (COLGRAVE et al., 2008).

17 Dentre todos os agentes citados, peptídeos reconhecidamente são os que demandam o  
18 maior interesse de mercado, pois exibem perfil farmacológico altamente atrativo já tendo sido  
19 amplamente isolados de animais e plantas.

20 *Moringa oleifera* Lam. está entre as espécies vegetais que também tem demonstrado  
21 propriedades anti-helmínticas contra *H. contortus*. Folhas e sementes parecem abrigar  
22 compostos de diferentes naturezas biológicas como agentes responsáveis pelos efeitos  
23 ovicidas observados (SALLES et al., 2014; TAYO et al., 2014).

24 Diante dos exemplos apresentados, fica claro que esforços constantes estão sendo  
25 feitos na tentativa de controlar os sérios prejuízos decorrentes dos elevados índices de  
26 infecção de caprinos e ovinos por parasitas gastrintestinais, em especial, *H. contortus*.  
27 Também fica nítido que estudos mais completos são necessários, a fim de converter as  
28 investigações em ferramentas práticas de uso. Vale ainda ressaltar que, a indicação de  
29 compostos naturais para o alívio de enfermidades não visa substituir os medicamentos  
30 químicos registrados e comercializados, mas sim oferecer alternativas terapêuticas com ação  
31 equivalente, de custo acessível e menos danosas aos animais, consumidores e ambiente.

### 2.3 *Moringa oleifera* Lamarck

A família Moringaceae é representada por um único gênero, *Moringa*, no qual se encontram distribuídas 13 espécies vegetais, sendo *Moringa oleifera* Lam. a espécie mais utilizada e mais bem conhecida. Originária do Noroeste da Índia, atualmente encontra-se distribuída em todas as regiões tropicais e subtropicais e tornou-se naturalizada em outras regiões da Ásia, África e América latina (RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980; BHATTI et al., 2007; PALIWAL; SHARMA, 2011).

*Moringa oleifera* Lam., também conhecida popularmente como lírio-branco, árvore-rabanete-de-cavalo, cedro, moringueiro e quiabo de quina, apresenta crescimento rápido, atingindo até 12 metros de altura. Suas condições de cultivos são bastante diversas desenvolvendo-se em regiões tropicais secas e subtropicais, regiões quentes, úmidas, além de tolerar diferentes tipos de solos, até mesmo os mais pobres, com exceção para os solos em condições de alagamento (NOUMAN et al., 2014).

Quanto aos aspectos botânicos (**Figura 2**), *M. oleifera* é uma espécie de porte arbóreo (5-12 m) de folhas caducas, apresenta um único tronco principal, uma ampla e típica copa em forma de guarda-chuva. As folhas são grandes e compostas (25-60 cm). A inflorescência é em panícula (8-30 cm), com flores brancas-creme, perfumadas, medindo cerca de 2,5 cm de diâmetro. Os frutos são cápsulas grandes e alongadas (18-50 cm de comprimento e 1-3 cm de largura) de coloração verde quando jovens e passando a marrom pálido quando maduros. São deiscentes e abrem-se em três válvulas quando totalmente maduros, expondo as numerosas sementes de cor marrom escuro com aspectos subglobosos ou ligeiramente triangular/trialadas (7-15 mm de diâmetro) (NAVIE; CSURHES, 2010).

**Figura 2** - Estrutura geral e diferentes partes de *Moringa oleifera* Lam.



Fonte: Próprio autor.

A – Árvore de moringa; B – Folhas e flores; C – Frutos; D – Sementes.

### 2.3.1 Usos tradicionais de *Moringa oleifera* Lam.

A diversidade de uso e aplicações de todas as partes de moringa tornou a espécie conhecida como “Árvore milagrosa” ou “ Dom natural”. Suas propriedades alimentícias e medicinais já eram exploradas desde a antiguidade. As ricas composições de nutrientes, aminoácidos, agentes antioxidantes, propriedades antienvhecimento e anti-inflamatória promoveram resultados tão interessantes quanto sua utilização nutricional e de cura (MAHMOOD; MUGAL; HAQ, 2010). Embora sejam registradas investigações e aplicações para os diferentes órgãos da planta, estudos acerca das propriedades de folhas e sementes são os mais frequentes (PATEL et al., 2014; AL-ASMARI et al., 2015; GALUPPO et al., 2015).

Moringa é potencialmente uma importante fonte de alimento e tem sido usada para combater a desnutrição que assola muitos países onde a fome é iminente. As folhas são ricas em diversos tipos de vitaminas (A, B, C, D, E e K), minerais, além de dispor de todos os aminoácidos essenciais em quantidades significativas e alto teor de proteínas (20%) de qualidade semelhante a do leite e ovos. Já em relação a fatores antinutricionais, apresentam baixas quantidades de taninos, fitatos, estando ausentes inibidores de tripsina, amilase, lectinas e glicosinolatos, sendo os dois últimos bastante representativos nas sementes dessa espécie (FAHEY, 2005; FERREIRA et al., 2008; MAHMOOD; MUGAL; HAQ, 2010; PALIWAL; SHARMA, 2011). Além das folhas, as vagens, sementes, flores e raízes têm sido consumidas tanto por seres humanos como por animais. O uso de moringa como forrageira e na suplementação de rações animais interessa não somente pela qualidade nutricional, mas também pela facilidade de cultivo, baixos custos e sustentabilidade que a espécie oferece (FERREIRA et al., 2008; MOYO; MASIKA; MUCHENJE, 2014; NOUMAN et al., 2014).

Associado aos benefícios alimentares, moringa tem sido referida como capaz de atuar na prevenção e tratamento de pelo menos 300 doenças (GANGULY, 2013). Propriedades anti-inflamatórias foram confirmadas para o extrato das sementes de moringa, cujas proteínas de ligação à quitina (Mo-CBP4) e lectinas (cMoL e WSMoL) previamente isoladas foram reportadas como sendo responsáveis pela referida atividade (PEREIRA et al., 2011; ARAÚJO et al., 2013). Propriedades antifúngicas de folhas e sementes de moringa foram também demonstradas contra diversas espécies de fungos de importância econômica. Gifoni et al. (2012) isolaram uma proteína termoestável ligante à quitina (Mo-CBP3) presente em sementes de moringa que foi capaz de inibir a germinação dos conídios de diferentes espécies fúngicas fitopatogênicas. Patel et al. (2014), trabalhando com extrato aquoso e etanólico das

1 folhas, também demonstraram o efeito antifúngico de moringa, porém a análise fitoquímica  
2 indicou a presença de flavonóides, taninos, esteróides, alcaloides e saponinas.

3 O potencial anti-helmíntico da espécie também é relatado. Investigações de tal  
4 atividade em sementes e no óleo das sementes exibiram efeito contra vermes de solo, sendo  
5 sugerida apenas a participação de compostos secundários (GIRI et al., 2010; NILANI et al.,  
6 2012). Tayo et al. (2014) observaram que diferentes extratos das folhas de moringa exibiram  
7 forte ação nematicida sobre quatro estádios de desenvolvimento do endoparasita *Haemonchus*  
8 *contortus*, contudo, novamente foram sugeridos apenas compostos do metabolismo  
9 secundário como responsáveis por tal efeito.

10 Salles et. al. (2014), examinando o potencial ovicida de diferentes espécies vegetais  
11 contra *H. contortus* sugeriram, pela primeira vez, que as propriedades anti-helmínticas das  
12 sementes de moringa poderiam estar relacionadas a moléculas de diferentes naturezas,  
13 inclusive proteica. Fração contendo compostos de massas moleculares abaixo de 12 kDa,  
14 obtida após diálise do extrato aquoso total das sementes em membrana de *cut off* 12 kDa,  
15 exibiu forte efeito inibitório sobre a taxa de eclosão dos ovos do parasita (inibição > 90%).  
16 Além do efeito ovicida, atividades hemaglutinante, hemolítica e inibitória de proteases foram  
17 detectadas para a referida fração. Porém, até o presente momento nenhum estudo havia sido  
18 realizado a fim de comprovar a relação de proteínas/peptídeos com as propriedades ovicidas  
19 observadas.

20 Além das atribuições farmacológicas já citadas, o uso da moringa para fins medicinais  
21 é muito amplo, havendo estudos abrangendo seus efeitos antimicrobianos, anticâncer,  
22 antioxidantes, hepatoprotetor, cardioprotetor, antidiabético, dentre outros (PARVATHY;  
23 UMAMAHESHWARI, 2007; NANDAVE et al., 2009; DEVENDRA et al., 2011; MOYO et  
24 al., 2012; AL-MALKI; EL RABEY, 2015; AL-ASMARI et al., 2015).

25 Outra característica bastante apreciável da moringa, e que a tornou popular  
26 mundialmente, é a imensa capacidade coagulante/floculante apresentada por suas sementes.  
27 As principais responsáveis por essa propriedade são moléculas de origem proteica. Peptídeos  
28 catiônicos solúveis em água com elevados valores de pI (9-11) e de massa molecular em torno  
29 de 6,5 kDa, bem como dímeros de 13 kDa, foram inicialmente descritos como sendo os  
30 componentes coagulantes de moringa (GASSENSCHMIDT et al., 1995;  
31 NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995). Posteriormente, Okuda et al. (2001)  
32 identificaram outro grupo de coagulantes, porém solúveis em solução salina, com massa  
33 molecular de 3 kDa e que não se tratava nem de proteínas ou polissacarídeos ou lipídeos, mas  
34 sim de polieletrólitos orgânicos. No entanto, Ghebremichael et al. (2005) mostraram que a

1 proteína/peptídeo de 6,5 kDa é extraível em ambas condições de extração, aquosa e salina, e  
2 através de análises por espectrometria de massa indicaram a presença de pelo menos quatro  
3 proteínas homologas. As lectinas WSMoL (20 kDa), cMoL (26,5 kDa), mais tarde isoladas,  
4 também demonstraram estar envolvidas com as propriedades coagulantes das sementes  
5 (SANTOS et al., 2005; SANTOS et al., 2009). Apenas uma proteína de alta massa molecular  
6 (66 kDa) foi relatada como agente coagulante (AGRAWAL; SHEE; SHARMA, 2007).  
7 Algumas das proteínas mencionadas acima além do eficiente poder de coagulação também  
8 compartilham importantes efeitos antibacterianos (GHEBREMICHAEL et al., 2005;  
9 FERREIRA et al., 2011; SHEBEK et al., 2015).

10 Como descrito, *M. oleifera* Lam. é uma espécie que contribui com uma enorme  
11 variedade de compostos bioativos capazes de serem utilizados em diferentes áreas.

#### 12

#### 13 **2.4 Potencial biotecnológico de peptídeos vegetais**

#### 14

15 Plantas são organismos constantemente expostos a estresses bióticos e abióticos de  
16 maneira que para garantirem a sobrevivência dependem de suas habilidades de defesa e  
17 adaptação. Além dos mecanismos de defesa constitutivos, os vegetais reagem às adversidades  
18 por meio de respostas induzidas que, geralmente, são traduzidas em alterações metabólicas  
19 incluindo, principalmente, alterações no padrão de expressão dos seus constituintes (PINTO;  
20 RIBEIRO; OLIVEIRA, 2011).

21 Diversos estudos têm demonstrado que assim como em animais, proteínas e peptídeos  
22 constituem os principais componentes químicos relacionados à defesa vegetal. Descobertas  
23 recentes de peptídeos multifuncionais e de suas relações com elaboradas vias de sinalização  
24 nas plantas têm revelado a grande importância dessas moléculas (FUKUDA;  
25 HIGASHIYAMA, 2011; KATSIR et al., 2011).

26 Atualmente, além do papel crucial na biologia e no desenvolvimento de organismos,  
27 os peptídeos são vistos como grandes promessas para indústria farmacêutica, sendo a  
28 biodiversidade vegetal considerada uma rica fonte de peptídeos ativos (PIMENTEL et al.,  
29 2015). O enorme potencial terapêutico dessas moléculas associado a características físico-  
30 químicas peculiares têm contribuído para seu reconhecimento biotecnológico. De maneira  
31 geral, peptídeos ou polipeptídeos constituem pequenas moléculas orgânicas de massas  
32 moleculares menores que 10 kDa (NELSON; COX, 2008) e que, particularmente, apresentam  
33 alta eficiência, baixa toxicidade e elevada seletividade, representando excelentes pontos de  
34 partida para o desenvolvimento de novas drogas. Talvez, essas características sejam a



1 principal diferença entre os peptídeos e as tradicionais pequenas moléculas químicas  
2 inorgânicas utilizadas como base para síntese da maioria dos fármacos (ALBERICIO;  
3 KRUGER, 2012; FOSGERAU; HOFFMANN, 2015).

4 Além das vantagens já citadas, a produção de novas drogas à base de peptídeos  
5 destaca-se até mesmo frente à utilização de outros compostos naturais como proteínas, por  
6 exemplo, que apresentam tamanhos e complexidade bem mais elevada. O tamanho reduzido  
7 de peptídeos favorece a obtenção de produtos mais simples, facilitando a síntese química,  
8 exigindo menor tempo de comercialização, as moléculas ainda dispõem de metabolismo  
9 previsível, baixas taxas de atrito, maior segurança e tolerabilidade (FOSGERAU;  
10 HOFFMANN, 2015). Obviamente, muitas dessas moléculas apresentam algumas fraquezas  
11 intrínsecas que limitam sua utilidade terapêutica. Aspectos como: baixa estabilidade química  
12 e física, meia-vida curta e rápida eliminação, baixa disponibilidade oral, tendência à hidrólise,  
13 oxidação ou agregação, além de baixa permeabilidade a membranas, são algumas das  
14 desvantagens. No entanto, muitas dessas limitações já podem ser eficazmente superadas  
15 através do chamado “design tradicional” de peptídeos terapêuticos (FOSGERAU;  
16 HOFFMANN, 2015).

17 Diante da gigantesca versatilidade peptídica, as moléculas descobertas vêm sendo  
18 identificadas e agrupadas considerando algumas características comuns, principalmente,  
19 estruturais. Assim, dividem-se em peptídeos helicoidais lineares; peptídeos cíclicos com  
20 estruturas em folha-beta com duas ou mais ligações dissulfeto; combinação de alfa-hélices e  
21 folhas-betas estabilizadas por ligações dissulfeto; peptídeos com disposição em grampo ou  
22 alça contendo pontes dissulfeto; peptídeos lineares com predisposição incomum para  
23 repetição de alguns resíduos especiais de aminoácidos, incluindo prolina, glicina, triptofano  
24 ou histidina e peptídeos curtos com estruturas helicoidais ou sem estruturas secundárias  
25 definidas (CÂNDIDO et al., 2014). A variação estrutural exibida pelos peptídeos contribui,  
26 fortemente, para suas inúmeras funcionalidades terapêuticas e o número de aplicabilidades  
27 biotecnológicas dessas moléculas tem revolucionado o mercado de biofármacos (PICCHI et  
28 al., 2009; CÂNDIDO et al., 2014).

29 Indispensáveis aos processos de imunidade vegetal, peptídeos antimicrobianos  
30 (AMPs) são os mais conhecidos e têm sido abundantemente isolados e relatados por seus  
31 amplos espectros de ação (BAHAR; REN, 2013). Em geral, essas moléculas derivam de  
32 grandes precursores e assumem rearranjos finais após sofrerem processamentos pós-  
33 traducionais distintos (ALMEIDA, 2007). AMPs antibacterianos são em sua maioria  
34 catiônicos e tem a membrana das bactérias como principal alvo de ação, tornando-as

1 permeáveis (MALANOVIC; LOHNER, 2015); AMPs antivirais neutralizam o vírus por  
2 integração tanto ao envelope viral ou a membrana da célula hospedeira  
3 (VANCOMPERNOLLE et al., 2015). Assim como os AMPs antibacterianos, os peptídeos  
4 antifúngicos podem matar fungos via parede celular ou através de componentes intracelulares.  
5 Muitos são capazes de se ligar à quitina aumentando a eficiência antifúngica (BAHAR; REN,  
6 2013; LAKSHMINARAYANAN et al., 2014); AMPs antiparasitários também apresentam  
7 interação direta com a membrana celular (BAHAR; REN, 2013; BITTENCOURT et al.,  
8 2016). Na verdade, muitas áreas terapêuticas vêm sendo contempladas com a potencialidade  
9 das ações peptídicas. Ultimamente, fortes demandas por peptídeos ativos têm sido voltadas  
10 para o tratamento de doenças metabólicas e de câncer (CHU et al., 2015; ROCHA et al.,  
11 2015).

12       Seja qual for o campo terapêutico, há uma percepção clara de que peptídeos  
13 configuram uma excepcional matéria-prima para síntese de novos fármacos e que  
14 investimentos em inovações tecnológicas têm sido fundamentais para garantir melhor  
15 liberação, absorção e eliminação dos princípios ativos no organismo.

16

17       O contexto geral aqui apresentado induziu à formulação da seguinte hipótese:

18

19       **Peptídeos presentes nas sementes de moringa constituem um importante grupo**  
20 **de moléculas anti-helmínticas que exercem efeitos negativos sobre ovos de *H. contortus***  
21 **impedindo o processo natural de eclosão.**

### **3 OBJETIVOS**

### 3.1 Objetivo geral

Isolar e caracterizar peptídeos com ação ovicida contra o parasita *Haemonchus contortus* a partir do extrato aquoso de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck.

### 3.2 Objetivos específicos

- Isolar peptídeos com ação ovicida a partir da fração não-retida em membrana de 12 kDa do extrato aquoso de sementes de *M. oleifera* utilizando *Haemonchus contortus* como modelo biológico e alvo de ação.
- Caracterizar parcialmente as moléculas obtidas através de determinação de suas massas moleculares, percentuais de estrutura secundária e ensaios bioquímicos *in vitro*.
- Avaliar a estabilidade das moléculas isoladas frente à ação de enzimas proteolíticas.
- Verificar se as moléculas isoladas apresentam efeito flocculante, bem como a relação entre essa atividade e o efeito ovicida.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 1 **4.1 Sementes de moringa**

2  
3 As sementes de *Moringa oleifera* Lam. foram obtidas a partir de único espécime  
4 vegetal localizado na cidade de Sobral, Ceará (3°40'47"S 40°21'21"W). As coletas foram  
5 realizadas em diferentes épocas do ano durante todo o período experimental (2014-2015),  
6 sendo as sementes mantidas sob armazenamento a 4 °C até o momento do uso.

#### 7 8 **4.2 Ovos de helmintos**

9  
10 Caprinos (raças Anglo-Nubiano e Saanen) e/ou ovinos (raça Santa Inês), naturalmente  
11 ou artificialmente infectados com *H. contortus*, foram utilizados como fontes de ovos frescos  
12 do parasita. Os animais experimentais foram mantidos em baias, no Campo Experimental da  
13 Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-CE e manuseados de acordo com as normas de proteção  
14 de animais experimentais preconizadas pelo *Guide for the Care and Use of Laboratory*  
15 *Animal, National Research Council, USA* (GCULA, 1996). O uso desses animais foi  
16 previamente autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa  
17 Caprinos e Ovinos, sob o número de protocolo 003/2015.

18 A suspensão contendo os ovos foi obtida através do processamento do material fecal  
19 coletado diretamente da ampola retal dos animais. Fezes frescas maceradas em água foram  
20 submetidas a filtrações sequenciais em tamises com malhas de granulações decrescentes (1  
21 mm; 0,105 mm; 0,055 mm e 0,025 mm). O material retido na última etapa de filtração (0,025  
22 mm) foi recuperado em água e centrifugado (3000 rpm/ 5 min). Ao precipitado resultante foi  
23 adicionada solução saturada de açúcar cuja densidade permite a flutuação dos ovos. Após  
24 centrifugação nas mesmas condições anteriores, o sobrenadante contendo os ovos foi filtrado  
25 (tamis 0,025 mm) e os ovos recuperados por retenção foram ressuspensos em água destilada  
26 (HUBERT; KERBOEUF, 1984).

#### 27 28 **4.3 Enzimas**

29  
30 As enzimas tripsina (EC 3.4.21.4; origem: pâncreas bovino; atividade: > 10.000  
31 unidades por mg de proteína), pronase E (EC 3.4.24.4; origem: *Streptomyces griseus*;  
32 atividade:  $\geq 4$  unidades por mg de sólido) e papaína (EC 3.4.22.2; origem: látex de mamão;  
33 atividade: 18 unidades por mg de proteína) foram adquiridas da Sigma-Aldrich (Saint Louis,  
34 USA).

#### 1 **4.4 Reagentes químicos e outros materiais**

2  
3 Ditioneitol (DTT), acrilamida, bisacrilamida,  $\beta$ -mercaptoetanol, tricina, albumina  
4 sérica bovina, *N*- $\alpha$ -benzoil-DL-arginina-p-naftilamida (BANA), *N*- $\alpha$ - benzoil-DL-arginina-p-  
5 nitroanilida (BApNA) e 4-(Dimethylamino)-cinnamaldehyde solution (DMACA) foram  
6 adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). Dodecil sulfato de sódio (SDS) foi  
7 adquirido da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). Marcador de massa molecular e azul de  
8 bromofenol foram adquiridos da Bio-Rad Laboratories (Hercules, Califórnia, EUA).  
9 *N,N,N',N'*,- tetrametiletilenodiamino (TEMED) e azul de coomassie brilhante G-250 foram  
10 adquiridos da Vetec Química Fina LTDA (Rio de Janeiro, Brasil). Coomassie Brilliant Blue R  
11 250 foi adquirido da Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Alemanha). Ivomec Solução  
12 Oral contendo ivermectina a 0,08% foi adquirida da Merial (Campinas, São Paulo, Brasil).  
13 As matrizes cromatográficas foram adquiridas da Sigma-Aldrich (Chitosan) e GE HeathCare  
14 (Source 30S). Membranas de celulose para tubos de diálise ( *cut off* 12 e 2 kDa) foram  
15 adquiridos da Sigma-Aldrich. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e  
16 obtidos comercialmente.

#### 17 18 **4.5 Obtenção do extrato aquoso de sementes de *M. oleifera* Lam. e fracionamento de** 19 **proteínas totais por membranas**

20  
21 Inicialmente, as sementes de *Moringa oleifera* Lam. foram submetidas à  
22 destegumentação manual e em seguida realizado o processamento de suas amêndoas em  
23 moinho elétrico para obtenção de uma fina farinha.

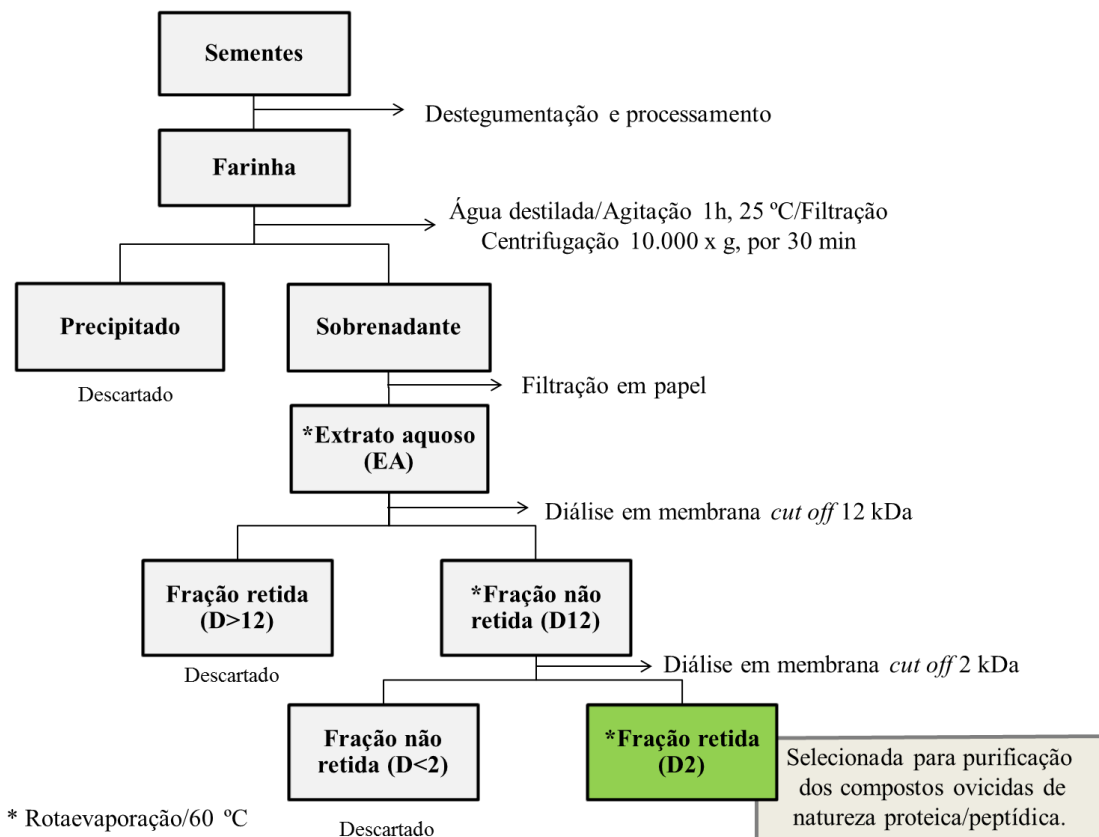
24 Sem qualquer tratamento prévio, a extração proteica ocorreu pela adição de água  
25 destilada à farinha obtida, obedecendo a uma proporção de 1:10 (m/v). A referida solução foi  
26 mantida sob agitação constante durante 1 hora em temperatura ambiente (25 °C). Após este  
27 período, a suspensão foi filtrada em pano de trama fina e o filtrado foi centrifugado a 10.000 x  
28 g por 30 min. O material precipitado foi descartado e o sobrenadante obtido denominado de  
29 extrato aquoso (EA) total.

30 O EA obtido a partir das sementes de moringa foi fracionado por diálise em membrana  
31 de *cut off* 12 kDa a 4 °C contra água destilada na proporção de 1:10 (EA/água), durante 48  
32 horas com trocas realizadas a cada 24 horas. Das frações resultantes do processo de diálise  
33 apenas a fração não retida na membrana, contendo moléculas menores de 12 kDa  
34 (denominada D12), foi selecionada para prosseguir nas investigações, pois como já

1 demonstrado por Salles et al. (2014) os agentes ovicidas presentes nas sementes de moringa  
 2 compreendem moléculas com massas inferiores a 12 kDa.

3 Em virtude da provável contaminação da fração D12 por metabólitos secundários, que  
 4 em sua maioria apresentam massas moleculares bem pequenas, atingindo o máximo de 3 kDa  
 5 no caso de alguns taninos (PEREIRA; CARDOSO, 2012), a referida fração foi então  
 6 submetida a um novo fracionamento em membrana de *cut off* 2 kDa. O material foi dialisado  
 7 exaustivamente contra água destilada, 4 °C, sendo a fração retida denominada D2 (**Figura 3**).  
 8 A fração D2, considerada como material de partida deste trabalho, foi utilizada em todas as  
 9 etapas posteriores de isolamento bioguiado de compostos de natureza proteica/peptídica com  
 10 ação ovicida. A obtenção de frações concentradas em cada uma das etapas anteriormente  
 11 citadas foi realizada em sistema de rotaevaporação a vácuo à temperatura de 60 °C.

**Figura 3** - Esquema de obtenção das frações proteicas das sementes de moringa.





## 4.6 Determinação de proteínas totais

A determinação da concentração de proteínas totais foi realizada seguindo metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando a albumina sérica bovina como padrão.

## 4.7 Análises eletroforéticas

### 4.7.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Frações proteicas foram analisadas eletroforéticamente de acordo com o método descrito por Laemmli (1970) utilizando géis de poliacrilamida 12,5% em condições desnaturantes (SDS-PAGE). As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, contendo SDS 1%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01% na presença ou ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol 5,0% e aquecidas a 100 °C, por 5 min, centrifugadas a 10.000 x g, 10 min, a 25 °C, antes da aplicação no gel. A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical (HOEFER SE 250, Amersham Biosciences), no qual os géis foram submetidos a uma voltagem de 500 V, amperagem de 20 mA e potência de 30 W. Como padrões de massas moleculares foi utilizado um kit (Bio-Rad) contendo: miosina (200 kDa),  $\beta$ -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). Após a corrida, os géis foram fixados em metanol 40% e ácido acético 10% por 30 min e em seguida mantidos em solução corante coloidal contendo sulfato de amônio 8%, ácido fosfórico 0,8%, metanol 20% e Coomassie Brilliant Blue G-250 0,08% até visualização das bandas.

### 4.7.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de tricina (Tricina-SDS-PAGE)

Para uma melhor resolução das bandas proteicas de baixa massa molecular presentes em D2 foi utilizada a técnica eletroforética descrita por Schagger e Von Jagow (1987). Géis de empilhamento, espaçamento e separação foram preparados em concentrações de acrilamida a 4%, 10% e 16%, respectivamente. Amostras de D2 foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8, contendo SDS 4%, glicerol 12% e azul de Coomassie G-250 0,01% na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol 2,0%. Adicionalmente, foram obtidas também amostras de D2

1 na presença de concentrações variáveis de 5 a 200 mM de ditioneitol (DTT). Após a adição  
2 de DTT, as amostras foram aquecidas a 100 °C, por 5 minutos, centrifugadas a 10.000 x g,  
3 10 min, a 25 °C, antes da aplicação no gel. As condições de corrida e revelação dos géis foram  
4 realizadas como já descritas acima. Análises densitométricas dos perfis eletroforéticos foram  
5 obtidas utilizando o software GelAnalyzer.

## 6 7 **4.8 Detecção de proteínas bioativas em D2**

### 8 9 **4.8.1 Atividade inibitória da papaína**

10  
11 Os ensaios para detecção da atividade inibitória da papaína (EC 3.4.22.2) foram  
12 realizados utilizando metodologia descrita por Abe et al. (1992). Alíquotas de 100 µL de  
13 solução de papaína (0,02 mg/mL) foram incubadas com 40 µL de solução ativadora preparada  
14 em tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 6,0 contendo EDTA (ácido etileno diaminotetracético)  
15 0,1 M e DTT 2 mM. Foram adicionados ainda, 300 µL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH  
16 6,0 e 200 µL de D2 (50 µg de proteínas) permanecendo por 10 minutos a 37 °C em banho-  
17 maria. Após esse intervalo, a reação foi iniciada adicionando-se 200 µL do substrato sintético  
18 *N*α-benzoil-DL-arginina-β-naphitilamida (BANA) em concentração de 1 mM. A reação  
19 permaneceu por 20 minutos nas mesmas condições de incubação e, após esse tempo, foi  
20 interrompida por adição de 500 µL de solução de HCl 2% em etanol. O material foi retirado  
21 do banho e após 5 minutos foi acrescentado 500 µL do cromógeno 4-  
22 Dimetilaminocinamaldeído (DMACA) 0,06%. Ao final de 30 minutos, a absorbância foi  
23 medida a 540 nm. Para mensurar a atividade papainásica (controle positivo), os 200 µL de  
24 amostra foram substituídos por tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,0. Nas provas em branco  
25 (controle negativo), a reação foi interrompida antes da adição do substrato (BANA). Os  
26 ensaios foram realizados em triplicata. A atividade inibitória foi expressa como atividade  
27 específica (UI/mg de proteína) e em porcentagem de inibição. Uma unidade de atividade  
28 inibitória de papaína (UI) foi definida como sendo a quantidade de inibidor necessária para  
29 reduzir a atividade da enzima em 0,01 da absorbância a 540 nm e a atividade da enzima na  
30 ausência da amostra testada foi considerada como 100% de atividade enzimática.

#### 1 **4.8.2 Atividade inibitória da tripsina**

2  
3 Os ensaios para detecção da atividade inibitória da tripsina (EC 3.4.21.4) foram  
4 realizados utilizando metodologia descrita por Erlanger et al. (1961), com algumas  
5 modificações. Às alíquotas de 80 µL de solução de tripsina 0,1 mg/mL em HCl 1 mM foram  
6 adicionados 200 µL de D2 (100 µg de proteínas) e tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 q.s.p 800  
7 µL. A mistura foi então incubada a 37 °C em banho-maria, por 10 minutos. Após esse  
8 intervalo, a reação foi iniciada adicionando-se 500 µL do substrato sintético  $\alpha$ -Benzoil-  
9 Arginina-p-Nitroanilida (BApNA) em concentração de 1 mM. A reação permaneceu por mais  
10 15 minutos nas mesmas condições de incubação e, após esse tempo, foi interrompida por  
11 adição de 200 µL de ácido acético 30%. Nas provas em branco (controle negativo), a reação  
12 foi interrompida antes da adição do substrato (BApNA). O material foi retirado do banho e  
13 após 10 minutos a absorbância foi medida a 410 nm. Para mensurar a atividade da tripsina  
14 (controle positivo) os 200 µL de amostra foram substituídos por tampão Tris-HCl 0,05 M, pH  
15 7,5. Os ensaios foram realizados em triplicata. A atividade inibitória foi expressa como  
16 atividade específica (UI/mg de proteína) e em porcentagem de inibição. Uma unidade de  
17 atividade inibitória de tripsina (UI) foi definida como sendo a quantidade de inibidor  
18 necessária para reduzir a atividade da enzima em 0,01 da absorbância a 410 nm e a atividade  
19 da enzima na ausência da amostra testada foi considerada como 100% de atividade  
20 enzimática.

#### 21 22 **4.8.3 Testes de capacidade flocculante**

23  
24 Água turva sintética para os testes de coagulação foi preparada de acordo com  
25 Ghebremichael et al. (2005). Suspensão de argila 1% preparada em água da torneira foi  
26 submetida à agitação por 30 minutos e em seguida mantida em repouso por 24 horas para  
27 completa hidratação. Após este período, o sobrenadante foi analisado a 500 nm, sendo  
28 definida como solução com turbidez ideal aquela que apresentasse OD<sub>500</sub> entre 0,6 e 0,8.  
29 Amostras de 10 µL de D2 (nativa, pós-digestão enzimática ou reduzida com DTT 200 mM),  
30 encerrando concentrações finais variando entre 0,5 e 10 µg de proteínas, foram adicionadas a  
31 1 mL da solução de argila em cubetas de plástico e homogeneizadas instantaneamente por  
32 inversão. Sulfato de alumínio 5% (polímero catiônico sintético) foi utilizado como controle  
33 positivo e a solução de argila na ausência das amostras foi utilizada como controle negativo.  
34 As misturas foram mantidas em repouso por 2 horas e a absorbância mensurada a 500 nm.

1 Valores de OD<sub>500</sub> referentes às amostras em água foram descontados da mistura final (amostra  
2 + solução de argila). Durante os primeiros 60 minutos a absorbância foi registrada em  
3 intervalos de 5 minutos, passando a intervalos de 10 minutos no tempo remanescente. Para  
4 amostras de concentrações inferiores a 2,5 µg de proteínas, registros da OD<sub>500</sub> após 24 horas  
5 de contato com a solução de argila foram necessários. A atividade floculante foi avaliada  
6 através de redução da absorbância da solução inicial. A porcentagem de floculação foi  
7 calculada considerando a OD<sub>500</sub> inicial das amostras como 100% de turvação.

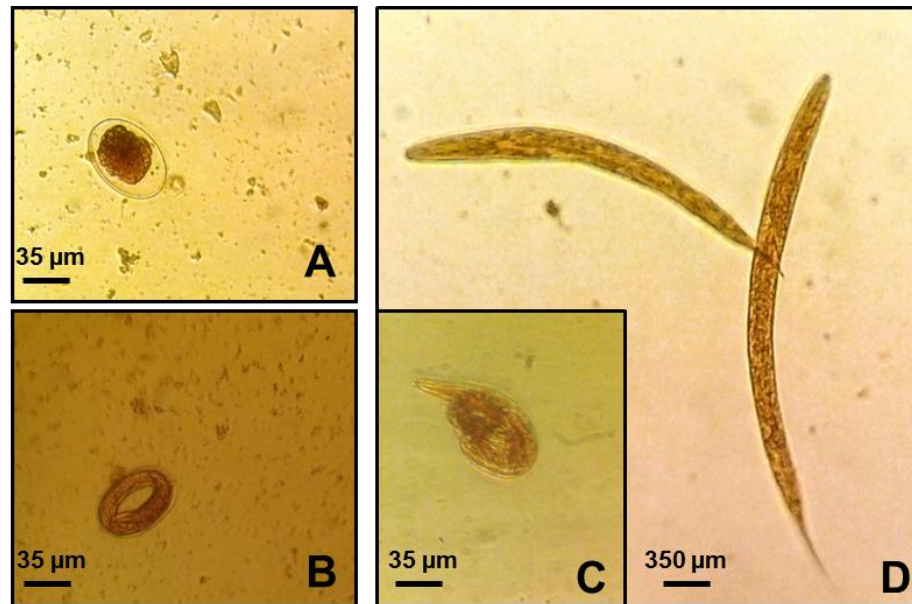
#### 9 **4.9 Resistência à proteólise com pronase E**

11 A resistência à proteólise de D2 (100 µg de proteína/mL) foi avaliada frente a  
12 diferentes tempos de exposição enzimática. As amostras foram submetidas à digestão com  
13 pronase E (0,1 mg/mL), sendo BSA utilizada como controle positivo. As reações foram  
14 realizadas a 37 °C empregando-se a relação de 1:100 (enzima:D2) em tampão Tris-HCl 0,025  
15 M, pH 7,5 com CaCl<sub>2</sub> 5 mM. Imediatamente após incubação com a enzima, foram retiradas  
16 alíquotas da solução de digestão (tempo zero). Novas alíquotas foram obtidas nos tempos de 6  
17 e 24 h. Ao final de cada intervalo de tempo, as reações foram interrompidas por aquecimento  
18 a 80 °C por 5 minutos. Os produtos das reações foram analisados por SDS-PAGE 12,5%  
19 seguindo a metodologia descrita anteriormente.

#### 21 **4.10 Efeito de D2 sobre a eclosão de ovos de *H. contortus* (COLES et. al., 1992).**

23 Para determinação do efeito ovicida de D2, suspensões (0,1 mL) de ovos frescos  
24 (n=100) foram distribuídas em placas de 24 poços, sendo acrescentadas alíquotas de 400 µL  
25 de D2 preparada em água destilada, encerrando concentrações finais de 20 a 100 µg de  
26 proteínas. Após homogeneização manual, as placas foram mantidas à temperatura ambiente  
27 (25 – 27 °C) por 24 h. Em seguida, 500 µL de uma solução de formol 5% foram adicionados  
28 em cada poço a fim de interromper o processo de desenvolvimento. A contagem do número  
29 de ovos e larvas de primeiro estágio - L1 (**Figura 4**) foi realizada por visualização em  
30 microscópio invertido com aumento de 100 vezes. As porcentagens de eclosão e de inibição  
31 da eclosão foram calculadas utilizando as fórmulas (1) e (2). Como controle positivo foi  
32 utilizado o anti-helmíntico sintético ivermectina 0,08%. Água destilada foi utilizada como  
33 controle negativo.

**Figura 4** - Ovos e larvas de primeiro estágio (L1) de *H. contortus* visualizados durante a contagem das placas.



Fonte: Próprio autor.

**A e B** – Ovo embrionado e larvado, respectivamente; **C** – L1 eclodindo; **D** – L1 eclodida. Aumento de 100 x.

#### FÓRMULAS:

$$\% \text{ eclos\~{a}o} = \frac{\text{n\~{u}mero de L1}}{\text{n\~{u}mero de ovos} + \text{n\~{u}mero de L1}} * 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ Inibi\~{c}\~{a}o da eclos\~{a}o} = 100 - \frac{\% \text{ eclos\~{a}o dos tratamentos}}{\% \text{ eclos\~{a}o do controle negativo}} * 100 \quad (2)$$

#### 1 **4.11 Obtenção do perfil cromatográfico de D2 em HPLC**

2  
3 Amostras bioativas solubilizadas em água ultra pura (5 µg de proteínas/mL), nativas e  
4 reduzidas com DTT (5, 50 e 200 mM), foram cromatografadas em sistema HPLC (High  
5 Performance Liquid Chromatography) utilizando cromatógrafo analítico Knauer Smartline  
6 Pump 1000, equipado com forno e detectores de ultravioleta-visível. Volumes de 100 µL de  
7 amostra foram injetados em coluna de sílica Eurospher (250 x 4 mm de diâmetro interno,  
8 partículas de 5 µm). Para eluição do material, foi utilizada uma alimentação isocrática com  
9 100% de água ultra pura durante 10 minutos à temperatura e vazão controladas em 15 °C e 1  
10 mL/min, respectivamente. As corridas foram monitoradas a 220 nm.

#### 11 12 **4.12 Cromatografia de troca iônica**

13  
14 Fração proteica D2 (1 mg de proteína) foi aplicada em coluna (1 x 5 cm) empacotada  
15 com matriz Source 30S, respeitando o tempo de 1 hora de contato. Para eluição do material  
16 não retido foi utilizada apenas água destilada (pH em torno de 6,5), enquanto que, para  
17 eluição do material retido foi utilizada uma alimentação do tipo “step-wise” com soluções em  
18 concentrações de 50, 100, 200, 500 mM e 1 M de NaCl. Em fluxo de 1 mL/min, frações de 2  
19 mL/tubo foram coletadas e suas absorbâncias monitoradas a 280 nm. Os picos retidos foram  
20 exaustivamente dialisados contra água destilada e submetidos a testes de bioatividade e  
21 análise eletroforética.

#### 22 23 **4.13 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD) dos picos obtidos na cromatografia de** 24 **troca iônica**

25  
26 Os espectros de CD dos picos cromatográficos obtidos em matriz Source 30S foram  
27 registrados em espectropolarímetro JASCO J-815, em atmosfera de nitrogênio a 25 °C, na  
28 faixa de 190 a 260 nm em cubetas de quartzo retangulares de caminho óptico de 1 mm, com  
29 uma média de 8 varreduras. As amostras encontravam-se dissolvidas em água, sendo a  
30 interferência da mesma subtraída dos espectros e os resultados expressos em elipticidade  
31 molar. As estimativas das contribuições de estrutura secundária por espectro de CD foram  
32 realizadas utilizando o servidor online K2D3 (LOUIS-JEUNE; ANDRADE-NAVARRO;  
33 PEREZ-IRATXETA, 2011).

#### 1 **4.14 Estudo do modo de ação do efeito ovicida de D2**

2  
3 Investigações acerca de possíveis modos de interação peptídeo/ovo foram realizadas  
4 levando em consideração propriedades químicas apresentadas pelas moléculas proteicas em  
5 estudo.

6 No intuito de obter indícios sobre possíveis vias de interação, D2 foi avaliada quanto a  
7 sua capacidade de ligação à quitina, um dos principais constituintes da casca do ovo de *H.*  
8 *contortus*, bem como de outros vermes. Amostras contendo aproximadamente 40 µg de  
9 proteína foram aplicadas em coluna de quitina (1 x 5 cm) a um fluxo de 2 mL/min. Após o  
10 tempo de contato de 1 hora, a coluna foi eluída com água destilada até completa remoção das  
11 moléculas não adsorvidas à matriz. A eluição de possíveis moléculas adsorvidas à quitina foi  
12 realizada com solução de ácido acético 1 M, pH 3. Frações de 2 mL/tubo foram coletadas e  
13 suas absorvâncias monitoradas a 280 nm. O pico retido foi imediatamente dialisado contra  
14 água destilada. Todos os materiais obtidos foram analisados através do teste de eclosão de  
15 ovos.

16 Mecanismo de interações eletrostáticas, atribuído ao efeito floculante de compostos  
17 dotados de alta densidade de cargas, foi também utilizado para especular o efeito ovicida de  
18 D2. Para tanto, D2 (80 µg de proteínas) e sulfato de alumínio (0,00125% - 0,0150%), ambas  
19 amostras carregadas positivamente, foram ensaiadas em teste de eclosão de ovos sendo o  
20 efeito ovicida das amostras também avaliado após alteração da força iônica do meio através  
21 da adição do eletrólito NaCl a uma concentração final de 0,15 M.

#### 22 23 **4.15 Análise estatística**

24  
25 Os resultados, cuja análise estatística se fizeram necessários, foram expressos com  
26 média ± erro padrão da média e a avaliação estatística foi realizada através de ANOVA. Teste  
27 de Bonferroni ao nível de significância de 0,05 foi utilizado para comparações múltiplas dos  
28 grupos de tratamento. Dados de EC50 e EC90 foram determinados utilizando o modelo de  
29 regressão linear através do programa estatístico *IBM SPSS Statistics 20*.

## **5 RESULTADOS**



## 5.1 Obtenção de fração proteica ovicida em sementes de moringa

Os conteúdos proteicos das diferentes frações obtidas a partir das sementes de moringa estão apresentados na **tabela 1**. O extrato aquoso (EA) exibindo concentração proteica média de  $3,988 \pm 0,005$  mgP/g de farinha ao ser avaliado quanto sua potencialidade ovicida *in vitro* foi capaz de inibir em  $96 \pm 0,8\%$  a taxa de eclosão de ovos de *H. contortus* quando utilizada uma concentração final de 50  $\mu$ g de proteína (**Figura 5**). Ao ser realizado o fracionamento do conteúdo de proteínas totais presentes no EA, através de diálise em membrana de 12 kDa, duas frações proteicas iniciais foram obtidas: a primeira, denominada D>12 ( $1,040 \pm 0,059$  mgP/gF), foi referente ao material retido na membrana e, portanto, contendo moléculas de altas massas moleculares ( $\geq 12$  kDa); já a segunda fração obtida foi correspondente ao material não retido na membrana, sendo denominada apenas D12 ( $0,146 \pm 0,028$  mgP/gF) e contendo moléculas de baixa massa molecular ( $< 12$  kDa). A fração de baixa massa (D12) deteve, completamente, o arsenal de moléculas ovicidas, sendo responsável por  $98 \pm 0,4\%$  (50  $\mu$ g de proteína) da taxa inibitória de eclosão (**Figura 5**).

Após confirmação de que apenas as moléculas com massa inferior a 12 kDa apresentavam efeito ovicida, dois grupos de moléculas ainda poderiam ser apontados como os responsáveis pela atividade em questão: proteínas/peptídeos e/ou metabólitos secundários. A fim de comprovar a relação de moléculas de origem proteica com a atividade ovicida, a fração D12 foi, então, submetida a um segundo processo de diálise, porém em membrana de *cut off* 2 kDa, uma vez que a grande maioria dos compostos provenientes do metabolismo secundário apresentam massas inferiores a 3 kDa. Como resultado dessa etapa, novamente foram obtidas moléculas retidas e não retidas na membrana, sendo estas frações denominadas de D2 e D<2, respectivamente. Ambas as frações obtidas exibiram potentes efeitos ovicidas demonstrados por taxas inibitórias da eclosão da ordem de  $82 \pm 1\%$  para D2, quando utilizada a concentração máxima de 100  $\mu$ g de proteína, e  $100 \pm 0\%$  para D<2 (**Figura 5**). Vale ressaltar que embora o efeito de D<2 tenha sido melhor, apenas D2 apresentou conteúdo proteico ( $0,038 \pm 0,002$  mgP/gF) e seu efeito foi semelhante ao da ivermectina usada como controle positivo. Logo, este resultado demonstra a existência de compostos de naturezas distintas envolvidos com o efeito ovicida exibido pelo EA das sementes de moringa. Buscando uma melhor caracterização da fração proteica com atividade ovicida, a fração D2 foi utilizada nas etapas subsequentes deste trabalho.

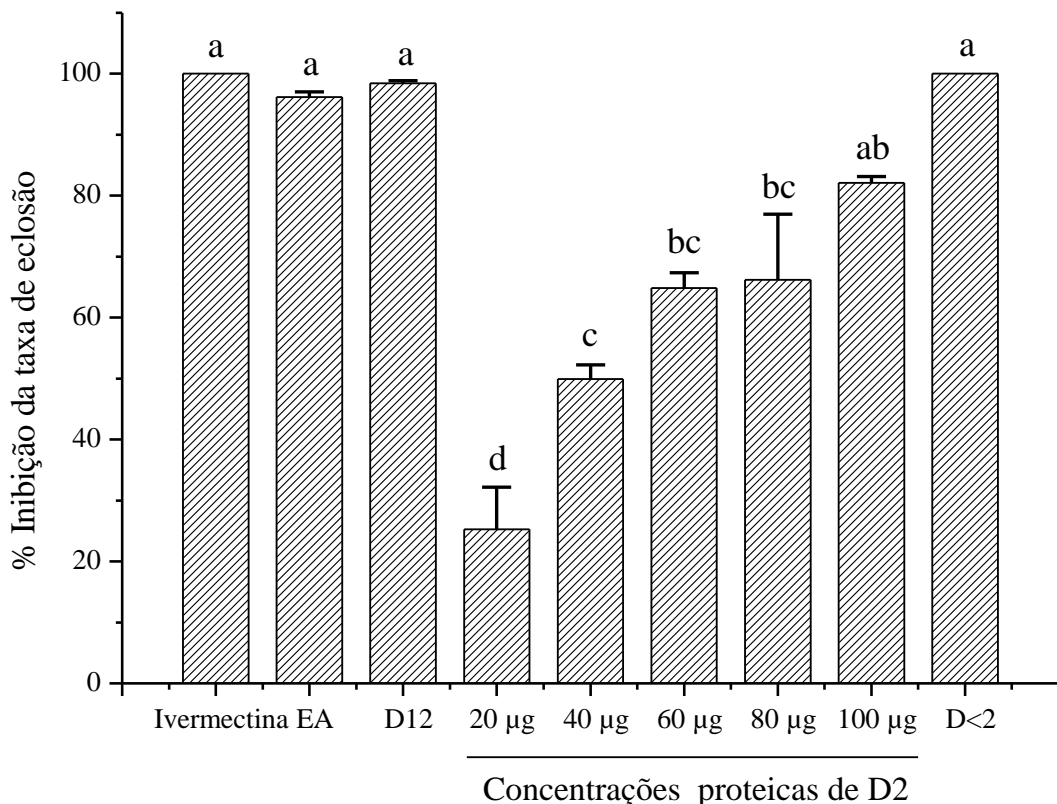
**Tabela 1** – Conteúdo proteico de frações obtidas a partir das sementes de *M. oleifera* Lam.

Frações	(mgP/gF) <sup>a</sup>	Rendimento (%) <sup>b</sup>
EA	3,988 ± 0,005	100
D>12	1,040 ± 0,059	26,1
D12	0,146 ± 0,028	3,7
D2	0,038 ± 0,002	1
D<2	ND*	-

EA: Extrato aquoso das sementes; **D>12** e **D12**: frações retidas e não retidas após diálise em membrana *cut off* 12 kDa, respectivamente; **D2** e **D<2**: frações retidas e não retidas após diálise em membrana *cut off* 2 kDa, respectivamente. **ND\***: Não detectado. Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores estão expressos em média ± desvio padrão.

<sup>a</sup> Quantidade total de proteína recuperada (mg) a partir de 1 g de farinha de *M. oleifera*.

<sup>b</sup> Rendimento proteico de cada fração (EA igual a 100%).

**Figura 5** - Efeito de frações de sementes de *M. oleifera* Lam. sobre a taxa de eclosão de ovos de *H. contortus*.

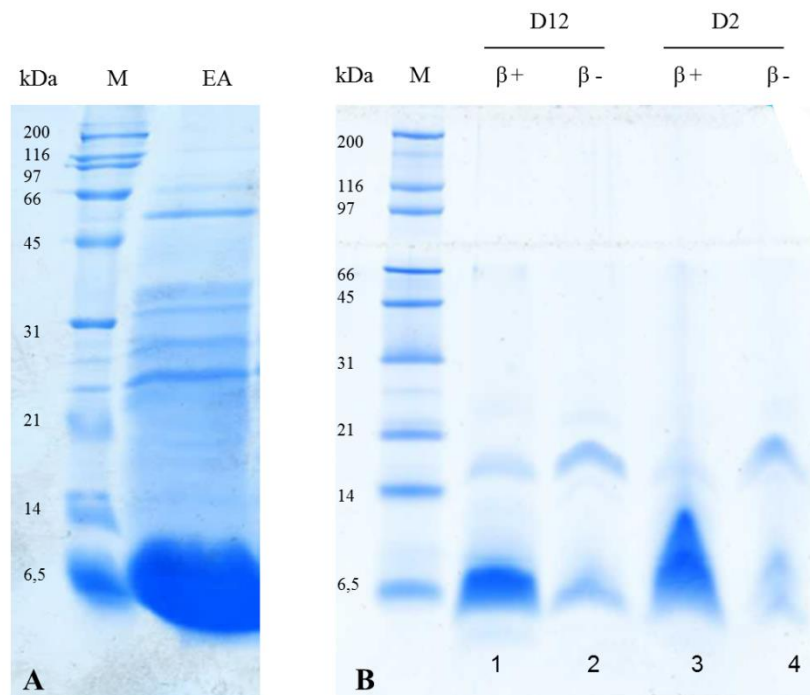
Teste *in vitro* de eclosão de ovos foi utilizado a fim de avaliar o efeito ovicida. Para amostras do extrato aquoso (EA) total e da fração **D12** foi utilizada a concentração proteica única de 50 µg. Para a fração **D2** concentrações variando entre 20 e 100 µg de proteínas foram testadas. Volumes de 400 µL foram utilizados para avaliar a atividade da fração não proteica **D<2**. Ivermectina 0,08% foi utilizada como controle positivo. Os valores estão expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Bonferroni.

## 5.2 Análises eletroforéticas e perfis cromatográficos em HPLC

2

3 Quanto ao perfil eletroforético das diferentes frações proteicas ativas (**Figura 6**) foi  
 4 observado que para o EA houve considerável variação de bandas, cujas massas moleculares  
 5 apresentaram-se abaixo de 97 kDa, com destaque para uma banda bastante proeminente de  
 6 aproximadamente 6,5 kDa. O perfil demonstrado pelas frações D12 e D2, contendo apenas  
 7 proteínas de baixa massa, foi comparado através de eletroforese em gel de tricina na presença  
 8 e ausência do agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol. O padrão proteico manteve-se o mesmo após  
 9 D12 ser dialisada em membrana de 2 kDa. Curiosamente, em ambas as formas reduzidas e  
 10 não reduzidas foram observadas duas bandas proeminentes: uma na altura de 6,5 kDa e outra  
 11 entre 14 e 21 kDa. No entanto, nas amostras contendo o agente redutor foi observado que a  
 12 banda de massa mais elevada tornou-se menos perceptível, enquanto que a banda de 6,5 kDa  
 13 tornou-se mais evidente.

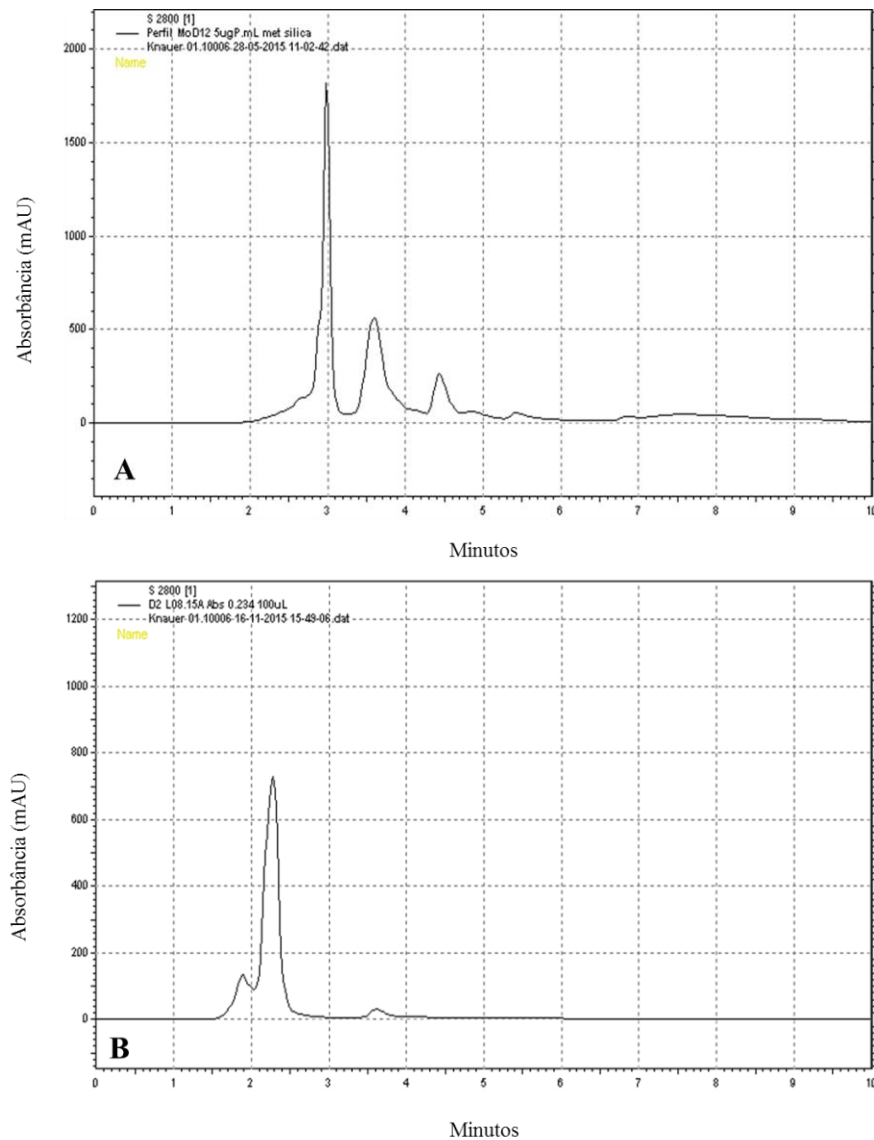
**Figura 6** - Perfil eletroforético de frações proteicas ovicidas presentes em sementes de *M. oleifera* Lam.



**A: SDS-PAGE 12,5%** - **M:** Marcador de massa molecular; **EA:** Extrato aquoso (10  $\mu$ g de proteína) dissolvido em tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, contendo SDS 1%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01% na presença  $\beta$ -mercaptoetanol 5%. **B: Tricina-SDS-PAGE** - Amostras de 1  $\mu$ g de proteína foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8, contendo SDS 4%, glicerol 12%, azul de coomassie G-250 0,01% na presença ( $\beta^+$ ) ou ausência ( $\beta^-$ ) de  $\beta$ -mercaptoetanol 2,0%; **Linha 1 e 2:** Fração D12 na presença e ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol, respectivamente; **Linha 3 e 4:** Fração D2 na presença e ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol, respectivamente; Coloração com Coomassie Coloidal G-250.

1           Análises comparativas entre D12 e D2 foram conduzidas em sistema HPLC a fim de  
2   avaliar quão eficiente foi o segundo processo de diálise, no que diz respeito à purificação dos  
3   compostos proteicos ativos. Para tanto, ambas as frações foram cromatografadas em coluna  
4   analítica de sílica (partículas: 5  $\mu\text{m}$ ). A **figura 7** mostra claramente que D12 apresentava  
5   picos referentes a compostos que foram eliminados após diálise em membrana de *cut off* 2  
6   kDa. Portanto, uma simples etapa adicional de separação por membranas foi capaz de  
7   fornecer material proteico ativo e com elevado grau de pureza.

**Figura 7** - Perfil cromatográfico (HPLC) de frações proteicas obtidas por diálises a partir do extrato aquoso das sementes de *M. oleifera* Lam.



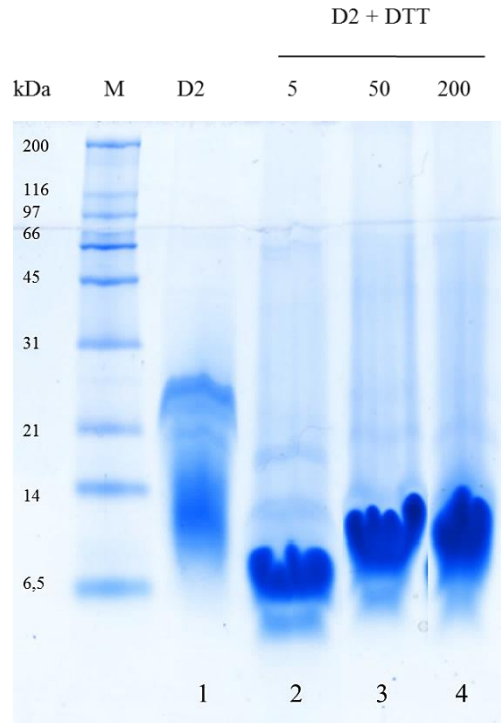
Os cromatogramas foram obtidos utilizando coluna de sílica (250 x 4 mm de diâmetro interno, partículas de 5  $\mu\text{m}$ ). Fase móvel 100% água ultrapura, fluxo de 1 mL/min, 15  $^{\circ}\text{C}$ . Volumes de 100  $\mu\text{L}$  de amostra (5  $\mu\text{g}$  de proteínas/mL) foram aplicados. **A** e **B**- Cromatogramas referentes às frações D12 e D2, respectivamente. As corridas tiveram duração de 10 minutos e a absorbância (mAU) foi monitorada a 220 nm.

### 1 **5.2.1 Associações em complexos proteicos**

2  
3 Após a obtenção de diferentes lotes da fração proteica D2, foi observado que os perfis  
4 eletroforéticos, mesmo na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, exibiam em comum uma banda mais  
5 evidente na região de 6,5 kDa, porém diversas outras bandas de massas moleculares bastante  
6 elevadas também eram frequentemente detectadas, além da banda entre 14 e 21 kDa mostrada  
7 anteriormente (**Figura 6**). Diante dessa situação, novas análises eletroforéticas de D2 sob  
8 condições nativas e reduzidas na presença de diferentes concentrações do agente redutor DTT  
9 (5, 50 e 200 mM) foram conduzidas (**Figura 8**). Em adição, análises densitométricas e em  
10 HPLC auxiliaram na interpretação dos resultados (**Figura 9**).

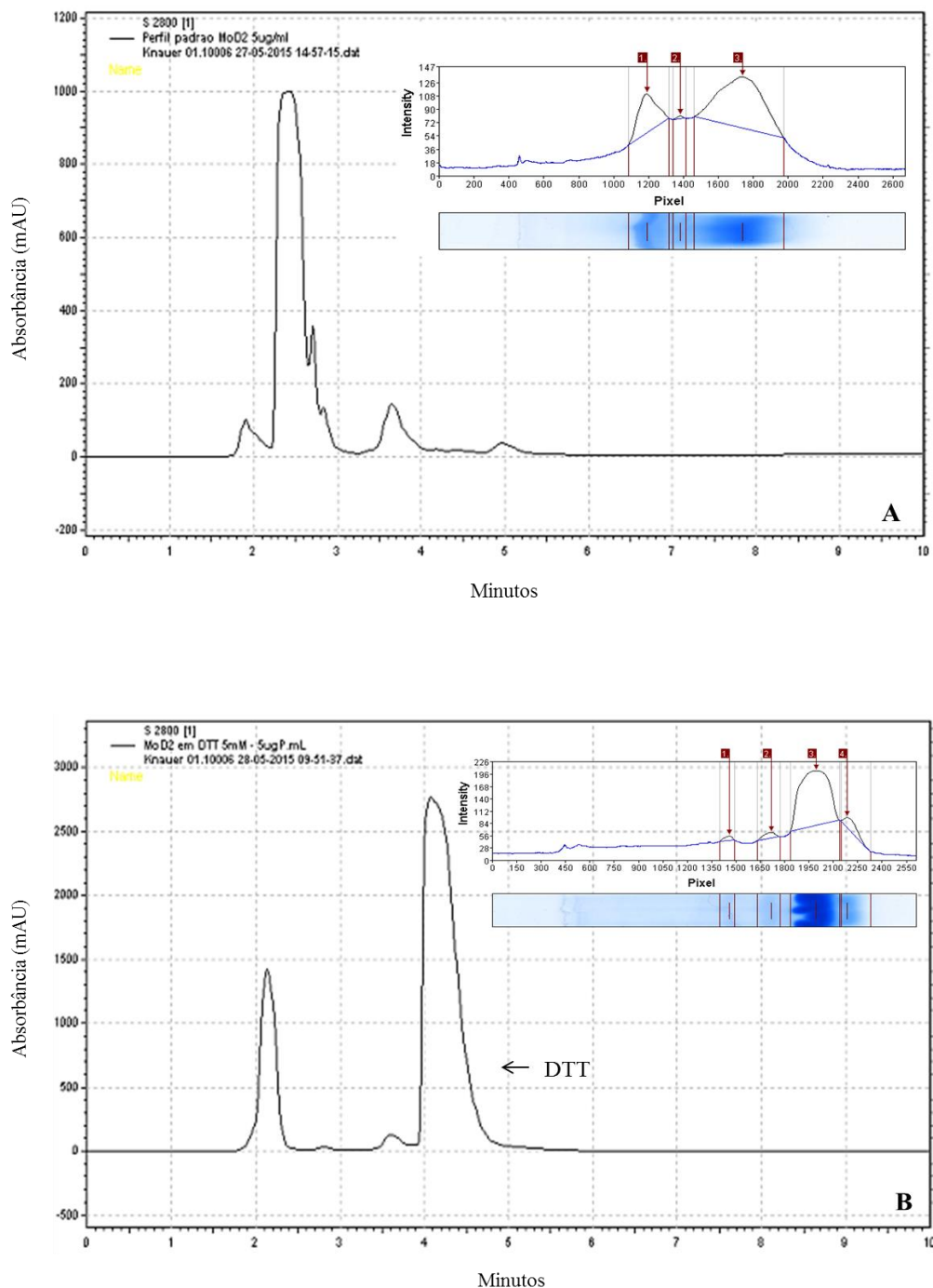
11 Sob condições não redutoras, D2 mostrou-se como bandas difusas de massas aparentes  
12 variadas, incluindo bandas de altas massas. A redução completa de D2 a uma banda única  
13 próximo a 6,5 kDa só foi alcançada quando a concentração máxima de 200 mM de DTT foi  
14 utilizada (**Figura 9D**). Perfis cromatográficos, obtidos em sistema HPLC, das amostras nas  
15 diferentes condições testadas e análises densitométricas do gel evidenciam a eliminação  
16 gradual de bandas correspondentes a proteínas de altas massas. No cromatograma para D2  
17 não reduzida (**Figura 9A**), um pico notório eluído nos três primeiros minutos foi  
18 correspondente à banda mais intensa observada no gel, representada por proteínas menores de  
19 14 kDa. Porém, notou-se que incrementos na concentração de DTT (**Figura 9B, C e D**) foram  
20 capazes de promover um aumento considerável na altura do referido pico (1400 mAU – 2800  
21 mAU), indicando um agrupamento de moléculas com características moleculares  
22 semelhantes, demonstrado por eluições em mesmos tempos de retenção.

**Figura 8** - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de tricina (Tricina-SDS-PAGE) da fração proteica D2 sob condições reduzidas e não reduzida com ditioneitol (DTT).

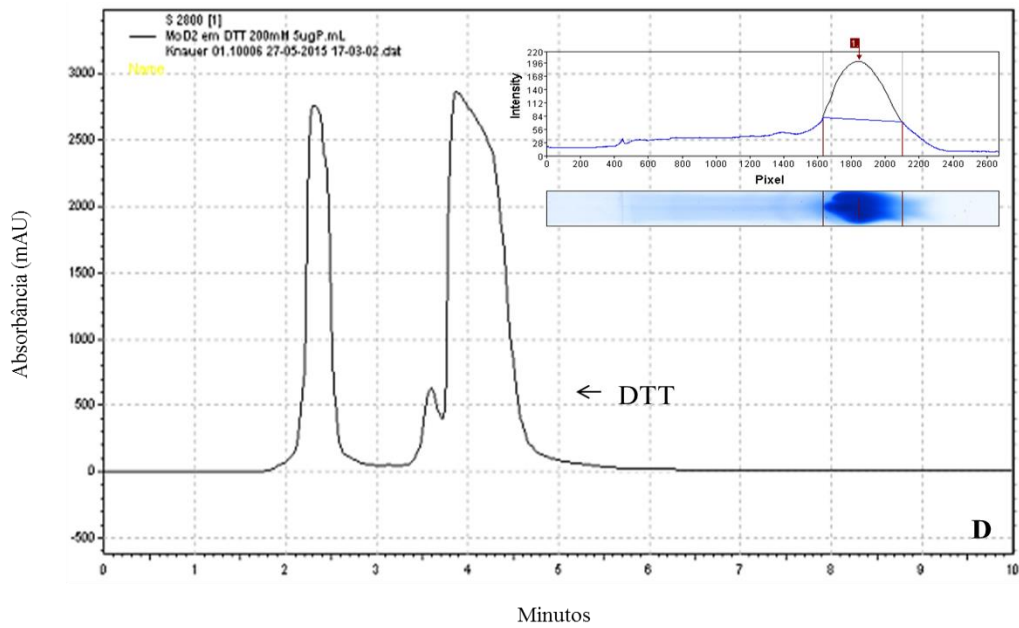
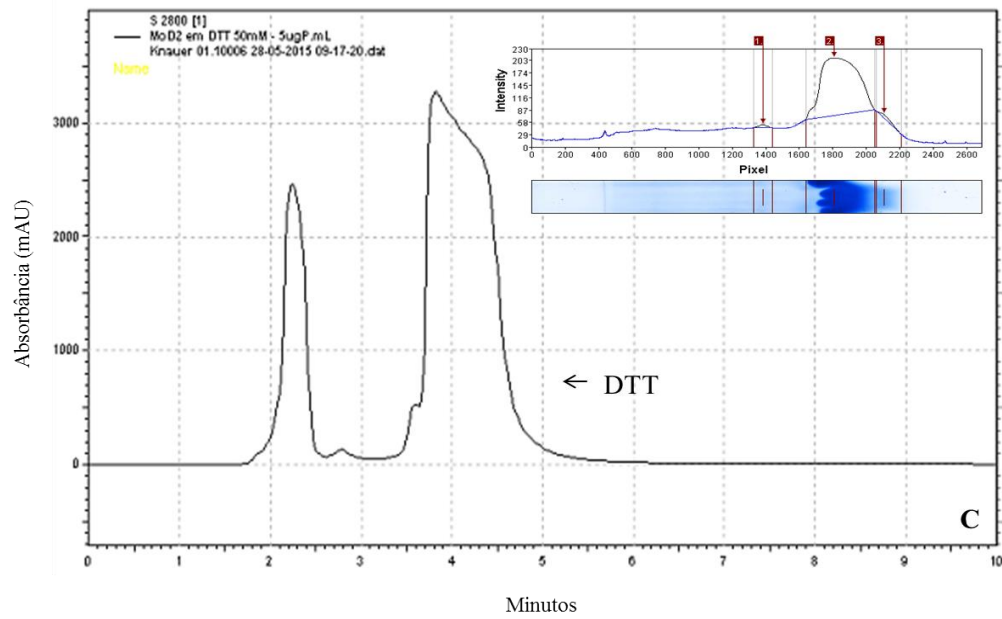


Amostras contendo 10  $\mu\text{g}$  de proteínas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, contendo SDS 1%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01% na presença ou ausência do agente redutor ditioneitol (DTT). **M**: Marcador de massa molecular; **Linha 1**: Fração proteica D2 sob condições não reduzidas; **Linhas 2, 3 e 4**: Fração proteica D2 reduzida com DTT nas concentrações de 5, 50 e 200 mM, respectivamente. Coloração com Coomassie Coloidal G-250.

**Figura 9** - Análises densitométricas e perfis cromatográficos (HPLC) obtidos da fração proteica D2 sob condições reduzidas e não reduzida com ditiotreitol (DTT).



Os cromatogramas foram obtidos utilizando coluna de sílica (250 x 4 mm de diâmetro interno, partículas de 5 µm). Fase móvel 100% água ultrapura, fluxo de 1 mL/min, 15 °C. Volumes de 100 µL de amostra (5 µg de proteínas/mL) foram aplicados. **A**: D2 na ausência de agente redutor; **B**: D2 reduzida com DTT 5 mM. A absorbância (mAU) foi monitorada a 220 nm. Setas indicam os picos referentes às eluições do agente redutor DTT. A análise densitométrica foi realizada através do software GelAnalyzer. Bandas detectadas nos geis são exibidas como picos, sendo estes proporcionais à intensidade da banda medida em pixels.



Os cromatogramas foram obtidos utilizando coluna de sílica (250 x 4 mm de diâmetro interno, partículas de 5  $\mu\text{m}$ ). Fase móvel 100% água ultrapura, fluxo de 1 mL/min, 15 °C. Volumes de 100  $\mu\text{L}$  de amostra (5  $\mu\text{g}$  de proteínas/mL) foram aplicados. **C** e **D**: D2 reduzida com DTT 50 e 200 mM, respectivamente. A absorbância (mAU) foi monitorada a 220 nm. Setas indicam os picos referentes às eluições do agente redutor DTT. A análise densitométrica foi realizada através do software GelAnalyzer. Bandas detectadas nos geis são exibidas como picos, sendo estes proporcionais à intensidade da banda medida em pixels.



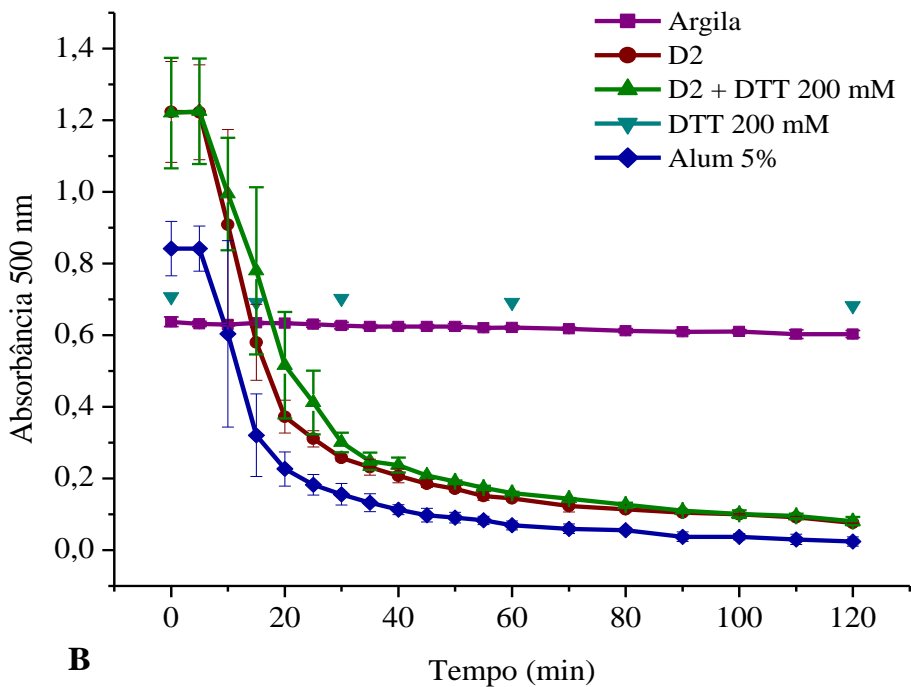
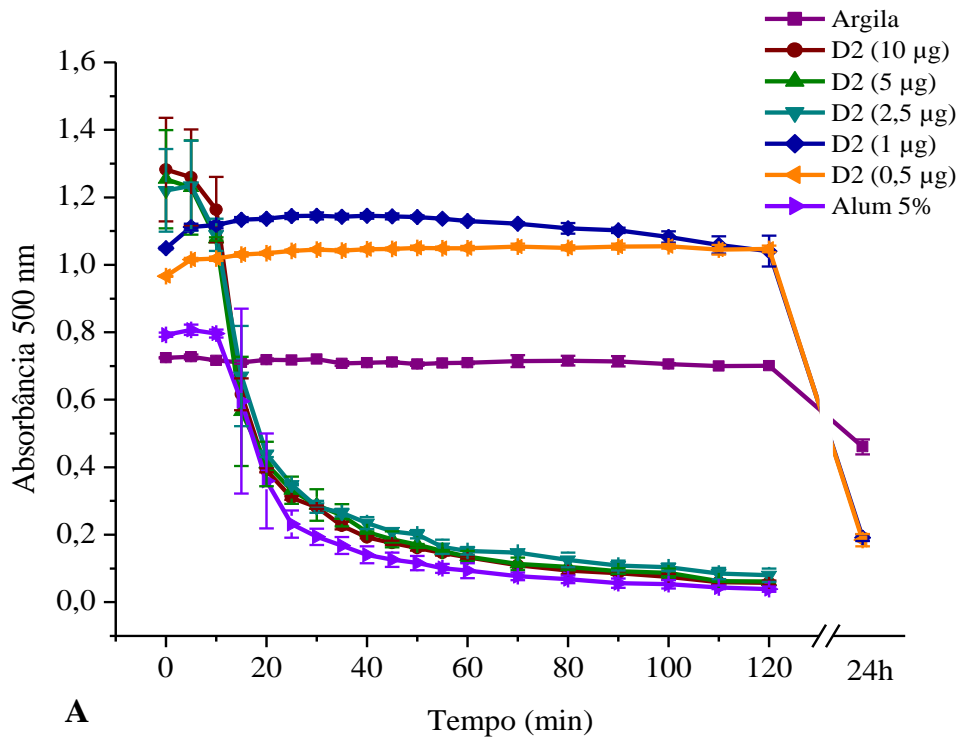
## 1 5.3 Detecção de proteínas bioativas em D2

### 3 5.3.1 Atividade flocculante

5 Testes de flocculação *in vitro* demonstraram que moléculas proteicas constituintes de  
6 D2, além de serem fortes agentes ovicidas, dispõem ainda de eficiente poder flocculante  
7 (**Figura 10A**). Mesmo em concentração final de 2,5 µg, D2 foi capaz de reduzir em  $92 \pm$   
8 1,5% a turbidez inicial de uma solução de argila, resultado esse semelhante ao obtido pelo  
9 sulfato de alumínio 5% (coagulante sintético) que promoveu redução de  $95 \pm 1\%$ . Diferenças  
10 expressivas na OD<sub>500</sub> foram observadas já entre os primeiros 15-20 minutos, havendo redução  
11 gradativa até o tempo final da análise. No entanto, para as amostras com concentrações  
12 inferiores 2,5 µg de proteínas o efeito flocculante só foi observado após 24 horas de contato  
13 (**Figura 10A**).

14 Uma vez que interações entre moléculas favorecendo a formação de complexos  
15 proteicos foram detectadas, surgiu o questionamento se as atividades dessas moléculas seriam  
16 inerentes às suas unidades monoméricas ou aos complexos por elas formados. Para tanto, D2  
17 na presença de DTT 200 mM foi novamente ensaiada quanto a sua capacidade ovicida e  
18 flocculante. O teste para avaliar a atividade inibitória da eclosão por D2 em seu estado  
19 reduzido foi invalidado, pois o agente redutor DTT teve alto efeito embriotóxico sobre os  
20 ovos de *H. contortus*. Visto que o DTT não interferiu no processo de flocculação, esse ensaio  
21 foi então utilizado para inferir os resultados de ambas as atividades (**Figura 10B**). A atividade  
22 das proteínas presentes em D2 permaneceu inalterada mesmo após completa redução.

**Figura 10** - Atividade floculante da fração proteica D2 de *M. oleifera* Lam.



**A:** Atividade floculante de D2 em concentrações variando entre 0,5 e 10 µg de proteínas/mL de solução de argila; **B:** Atividade floculante de D2 (2,5 µg) na ausência ou presença de DTT 200 mM (10 µL). A absorbância (densidade óptica) foi monitorada a 500 nm por 2 ou 24 horas. Sulfato de alumínio 5% (Alum 5%) foi utilizado como controle positivo. Os controles negativos correspondem às suspensões de argila e DTT 200 mM na ausência de proteínas.

### 5.3.2 Atividade inibitória de proteases

Na presença de D2, a uma concentração proteica final de 100 µg, a hidrólise do substrato sintético BApNa pela enzima tripsina foi parcialmente comprometida, havendo inibição de aproximadamente 41% da atividade enzimática (**Tabela 2**).

Quanto à capacidade de D2 em inibir proteases do tipo cisteínicas, resultados surpreendentes foram detectados. Quando utilizados apenas 50 µg de proteínas, D2 foi capaz de inibir cerca de 99% a ação hidrolítica da papaína sobre o substrato sintético BANA (**Tabela 2**). Estes resultados demonstram o potencial de D2, também, como importantes inibidores de proteases.

**Tabela 2** - Efeito da fração proteica D2 de *M. oleifera* Lam. sobre a atividade enzimática da tripsina e papaína.

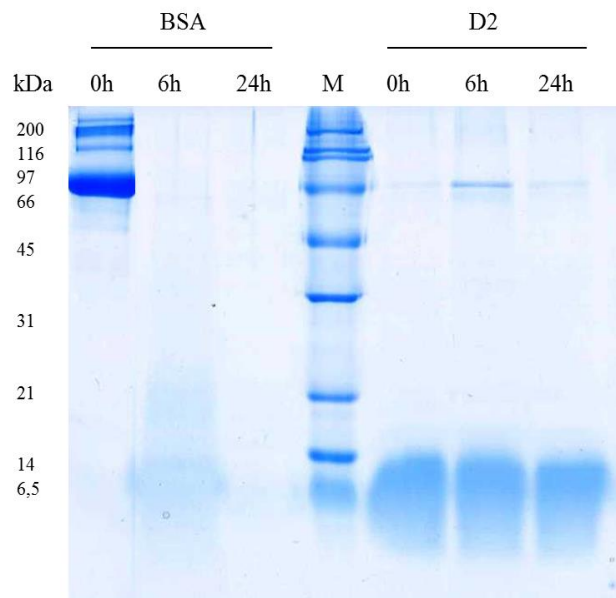
Fração proteica	Atividade inibitória da tripsina		Atividade inibitória da papaína	
	% de Inibição	Ativ. específica (UI/mg de proteína)	% de Inibição	Ativ. específica (UI/mg de proteína)
D2	40, 65 ± 10,8	138	99,22 ± 0,22	634

### 5.4 Avaliação da estabilidade proteolítica de D2

Uma vez que D2 exibiu efeito inibitório apenas parcial sobre a ação enzimática da tripsina, seu grau de estabilidade proteolítica frente à digestão com proteases serínicas foi investigado. Incubação de D2 com pronase E (mistura de proteases serínicas) foi realizada sob condições controladas de temperatura (37 °C), utilizando BSA como controle positivo da reação. A digestão foi acompanhada em diferentes intervalos de tempo (0, 6 e 24 horas) e os resultados avaliados por SDS-PAGE (**Figura 11**).

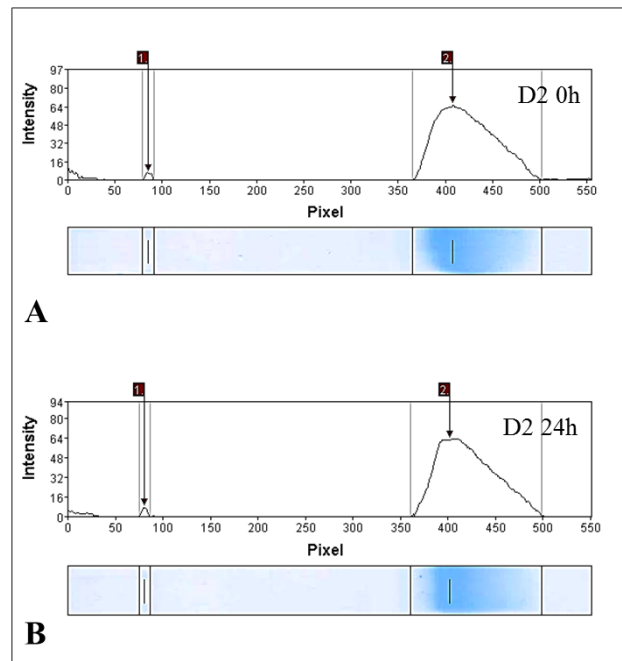
A análise dos géis revelou que D2, aparentemente, manteve-se estável à proteólise mesmo após 24 horas de digestão enzimática. Buscando outras evidências que comprovassem esses resultados, o perfil de D2 em 0 e 24h também foi avaliado por densitometria e em sistema HPLC (**Figuras 12 e 13**). Tais análises confirmaram a inalteração do perfil de D2 após o processo de digestibilidade *in vitro*, indicando alto grau de resistência à proteólise.

**Figura 11** - Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE 12,5%) de D2 e BSA antes e após ensaio de digestibilidade *in vitro* com pronase E.



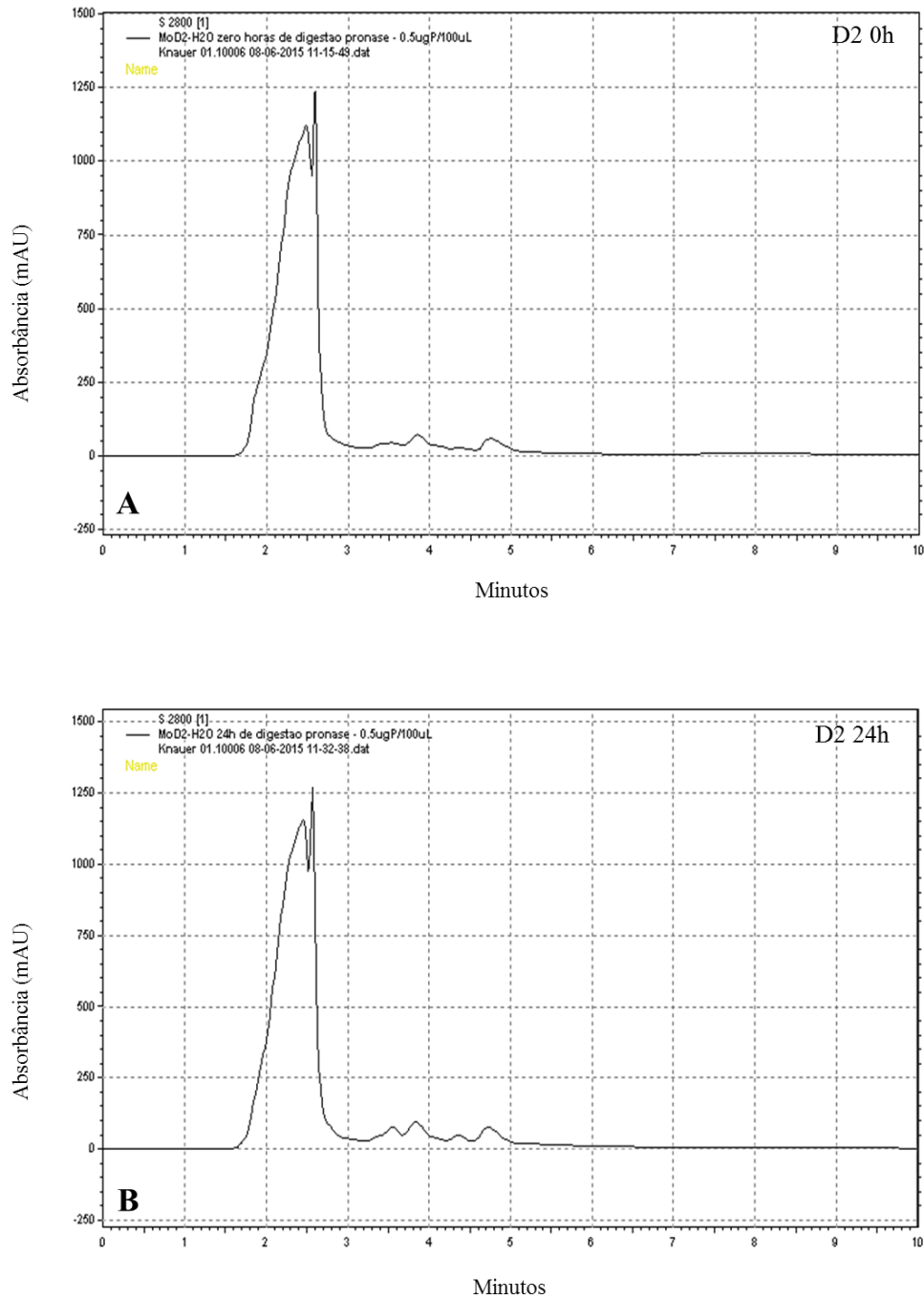
Amostras contendo aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  de proteínas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, contendo SDS 1%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01% na presença  $\beta$ -mercaptoetanol 5%. Coloração com Coomassie Coloidal G-250.

**Figura 12** - Análises densitométricas dos perfis eletroforéticos de D2 antes e após ensaio de digestibilidade *in vitro*.



As SDS-PAGES 12,5% de D2 antes e após ensaio de digestibilidade *in vitro* foram analisadas por densitometria através do software GelAnalyzer. Bandas detectadas nos geis são exibidas como picos, sendo estes proporcionais à intensidade da banda medida em pixels. **A** e **B** - Perfis densitométricos de D2 nos tempos 0 e 24 h de digestão com pronase E, respectivamente.

**Figura 13** - Perfis cromatográficos (HPLC) obtidos da fração proteica D2 de *M. oleifera* Lam. antes e após ensaio de digestibilidade *in vitro*.



Os cromatogramas foram obtidos utilizando coluna de sílica (250 x 4 mm de diâmetro interno, partículas de 5  $\mu$ m). Fase móvel 100% água ultrapura, fluxo de 1 mL/min, 15 °C. Volumes de 100  $\mu$ L de amostra (5  $\mu$ g de proteínas/mL) foram aplicados. **A** e **B** – Perfis cromatográficos de D2 nos tempos 0 e 24 h de digestão com pronase E, respectivamente. A absorbância (mAU) foi monitorada a 220 nm.

1 A correlação positiva entre atividade flocculante e ovicida presente nos peptídeos  
 2 constituintes da fração D2 foi considerada para avaliar a atividade das amostras pós digestão.  
 3 EC50 e EC90 para ambas as atividades foram determinadas através do modelo de regressão  
 4 probit em software *IBM SPSS Statistics 20* (**Tabela 3**). A obtenção de EC90, para atividade  
 5 flocculante, com uma quantidade proteica cerca de 250 vezes menor do que a necessária para  
 6 obter o mesmo efeito em relação à ação ovicida permitiu que o simples e rápido ensaio de  
 7 flocculação pudesse ser utilizado para monitorar, indiretamente, a atividade ovicida das  
 8 amostras (**Figura 14**).

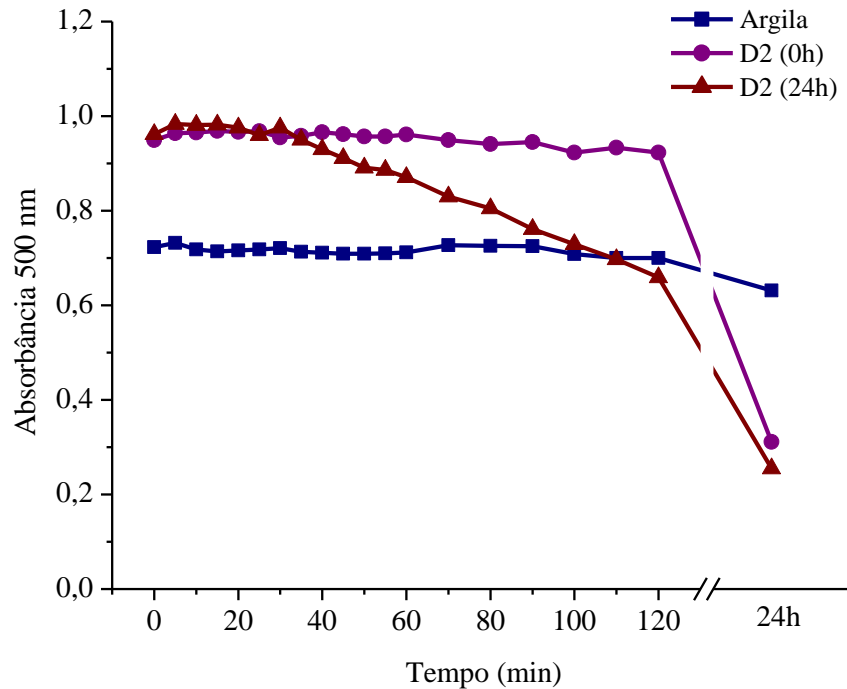
9 Mesmo após 24 horas de digestão enzimática ainda foi detectada atividade flocculante  
 10 de D2. No entanto, em ambas as amostras correspondentes aos tempos 0 e 24h da digestão  
 11 com pronase E, a atividade só foi apreciável após 24 horas de contato com a suspensão de  
 12 argila (**Figura 14**). Este resultado se deve, provavelmente, à baixa quantidade proteica das  
 13 amostras, uma vez que, para quantidades menores que 2,5 µg de proteínas a capacidade  
 14 flocculante mostra-se fortemente dependente do tempo.

**Tabela 3** - Determinação da concentração efetiva de 50% (EC50) e 90% (EC90) para as atividades flocculante e ovicida da fração proteica D2 de *M. oleifera* Lam.

Atividades	D2 (µg de proteínas)	
	EC50 (LC 95%)	EC90 (LC 95%)
Flocculante	0,001 (-)	0,812 (-)
Ovicida	42,399 (35,794 - 49,649)	202,277 (138,703 - 401,623)

Valores entre parênteses indicam limite de confiança de 95%.  
 (-): valores não detectados.

**Figura 14** - Atividade floculante da fração proteica D2 de *M. oleifera* Lam. antes e após ensaio de digestibilidade *in vitro*.



Alíquotas de D2 em concentrações estimadas entre 1 e 2,5  $\mu\text{g}$  de proteínas foram avaliadas antes e após digestão com pronase E. A absorbância (densidade óptica) foi monitorada a 500 nm por 24 horas. Solução de argila na ausência de amostras foi utilizada como controle negativo.

## 1 5.5 Cromatografia de troca iônica

2

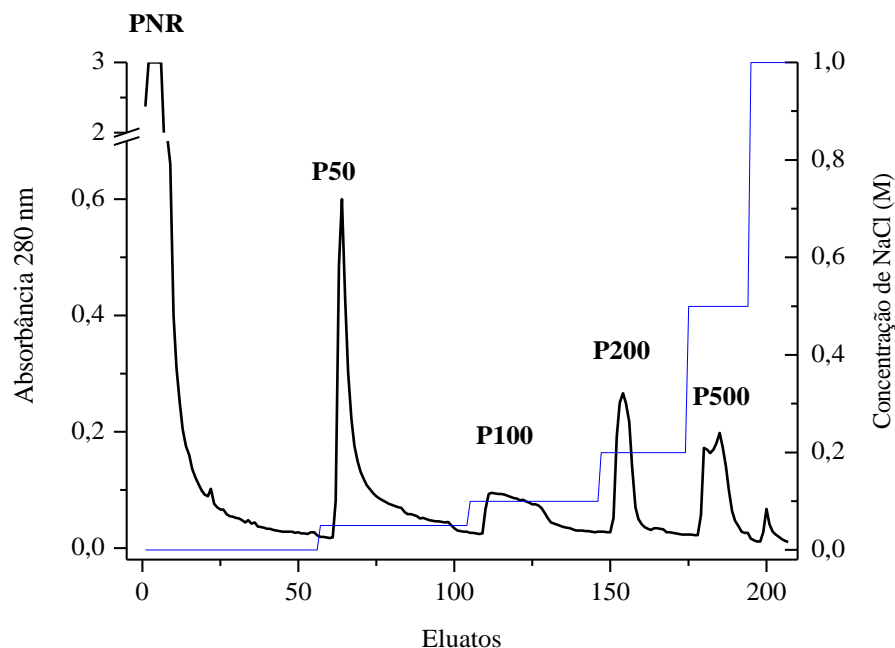
3 O perfil cromatográfico proveniente desta etapa resultou na separação de D2 em pelo  
 4 menos cinco picos (**Figura 15**). O primeiro pico, designado de PNR, foi referente ao material  
 5 não adsorvido, enquanto os picos remanescentes representaram o material eluído em  
 6 condições diferenciadas de sal e, portanto, designados de P50, P100, P200 e P500, referentes  
 7 às respectivas concentrações de NaCl necessárias para romper a interação dos mesmos com a  
 8 matriz. A análise eletroforética desses picos revelou que os compostos adsorvidos na coluna,  
 9 embora apresentassem diferentes forças de interação com a matriz, sob condições reduzidas  
 10 mostraram-se todos como fortes bandas difusas de massa molecular aparente de 6,5 kDa  
 11 (**Figura 16**). Logo, a banda única de 6,5 kDa inicialmente observada para fração D2, na  
 12 verdade tratava-se de uma mistura de, pelo menos, quatro isoformas proteicas com  
 13 características moleculares bastante semelhantes. O elevado grau de pureza dos diferentes

1 picos foi demonstrado por análise do material em sistema HPLC, cujos cromatogramas  
2 obtidos podem ser observados na **figura 17**.

3 Tanto atividade ovicida quanto flocculante foi demonstrada por todos os quatro picos  
4 proteicos. As diferentes isoformas, mesmo separadamente, exibiram efeito inibitório da  
5 eclosão semelhante ao observado para Ivermectina 0,08% (**Figura 18**). P100 exibindo  
6 inibição da taxa de eclosão de  $84,6 \pm 4,7\%$  foi o único a diferir significativamente ( $P < 0,05$ )  
7 em relação ao controle positivo. Quanto à atividade flocculante, índices maiores que 90% de  
8 redução da turbidez foram alcançados, exceto para P50, que reduziu em cerca de 68% a  
9 turbidez inicial de solução de argila (**Figura 19**).

10 Embora essa etapa cromatográfica tenha elevado consideravelmente o grau de pureza  
11 das proteínas ovicidas de moringa (**Figura 17**), devido ao baixo rendimento obtido no  
12 decorrer do processo não foi possível (até o presente momento) quantificar o real fator de  
13 purificação alcançado, sendo este estimado apenas até as etapas anteriores (**Tabela 4**).

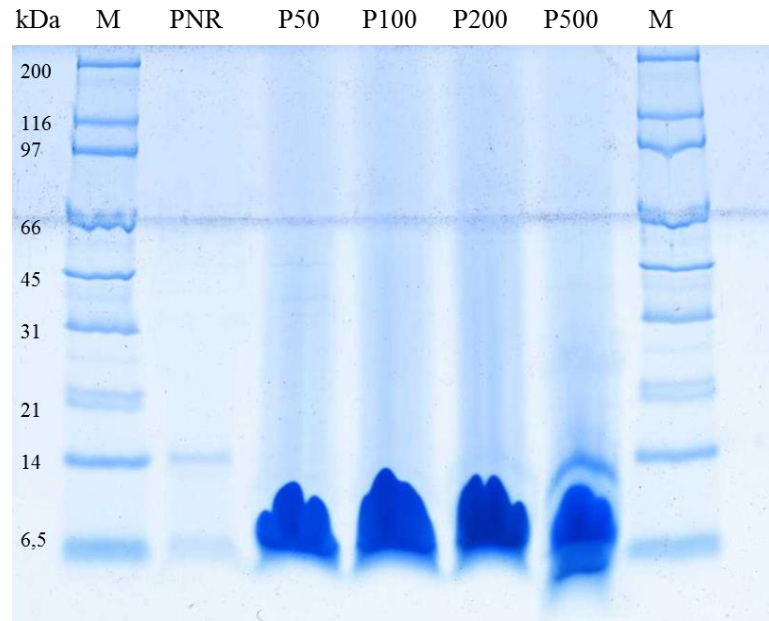
**Figura 15** - Perfil cromatográfico da fração proteica D2 de *M. oleifera* Lam. em matriz de troca iônica (Source 30S).



Volumes de 2 mL da fração proteica D2 (0,5 mg/mL) foram aplicados em coluna (5 x 1 cm) de resina catiônica (Source 30S) permanecendo em contato com a matriz por 1 hora antes do início da eluição. **PNR** – Pico não retido eluído com água destilada; **P50 - P500** - Picos retidos e eluídos com *stepwise* salino de 50, 100, 200 e 500 mM de NaCl, respectivamente. Frações de 2 mL/tubo foram coletadas em fluxo de 1 mL/min e monitoradas a 280 nm.

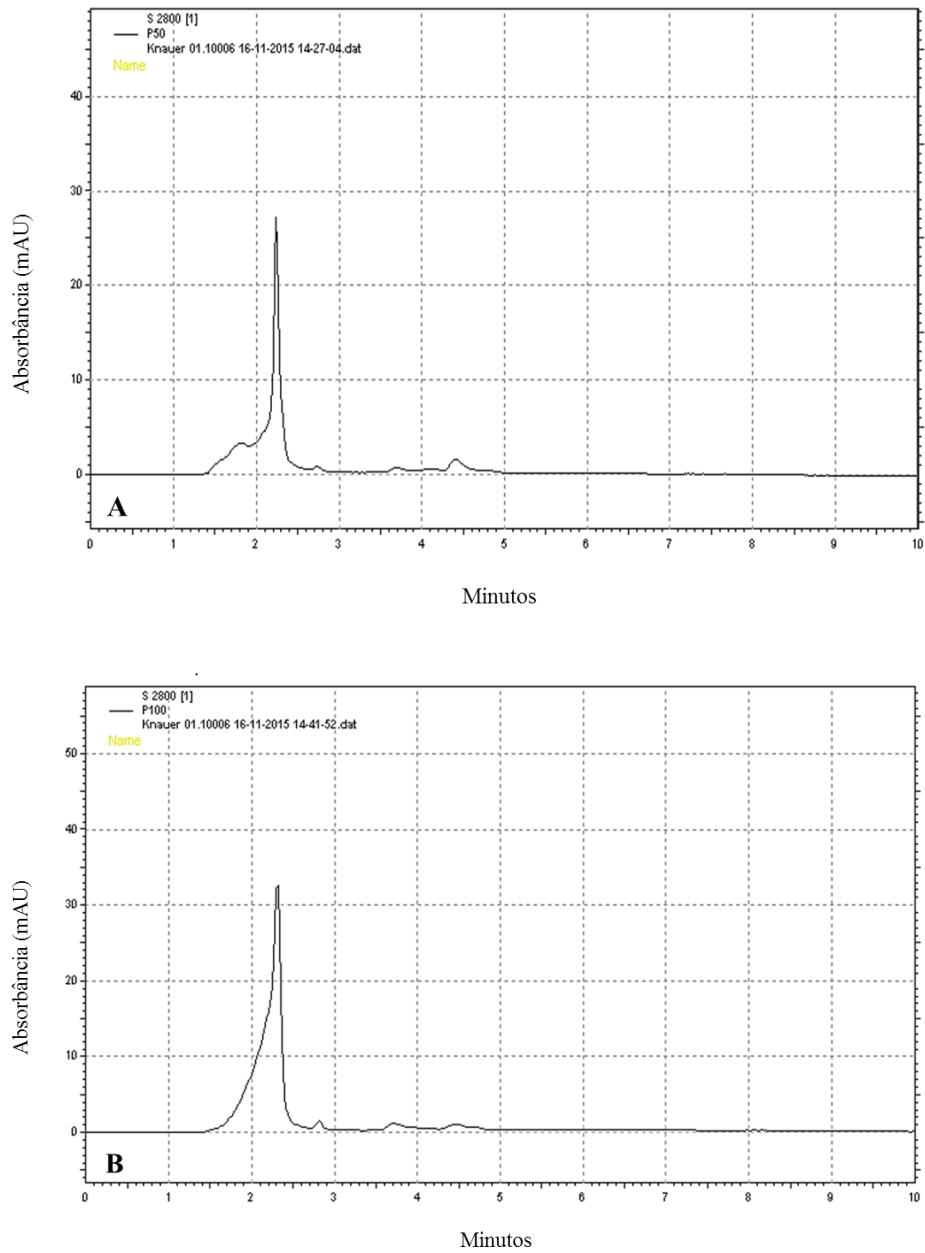


**Figura 16** - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de tricina (Tricina-SDS-PAGE) dos picos resolvidos em matriz de troca iônica (Source 30S).

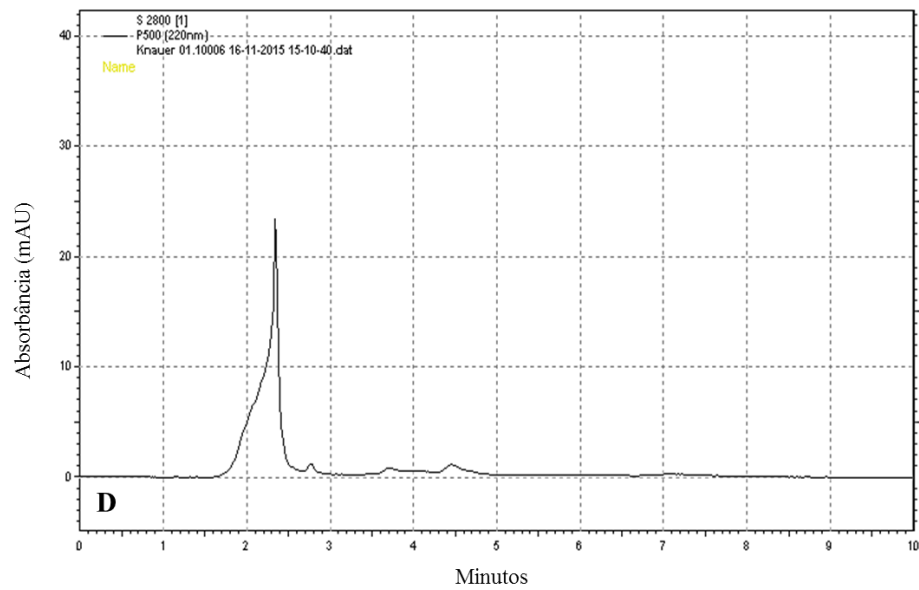
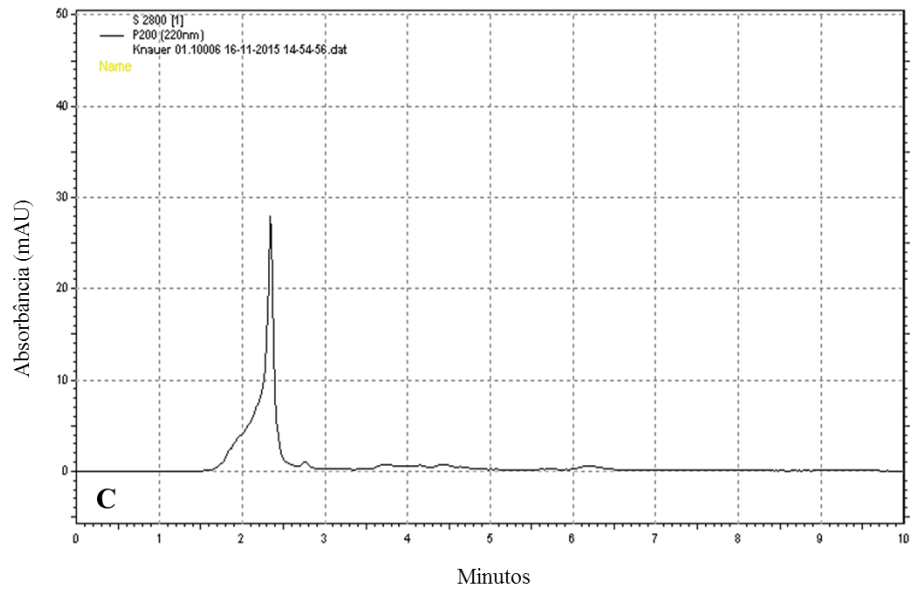


Amostras contendo cerca de 3  $\mu\text{g}$  de proteínas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, contendo SDS 1%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01% na presença do agente redutor DTT 200 mM. **M:** Marcador de peso molecular; **PNR:** Pico não retido; **P50-P500:** Picos retidos e eluídos com as respectivas concentrações de NaCl. Coloração com Coomassie Coloidal G-250.

**Figura 17** - Perfis cromatográficos (HPLC) dos diferentes picos proteicos obtidos em cromatografia de troca iônica.

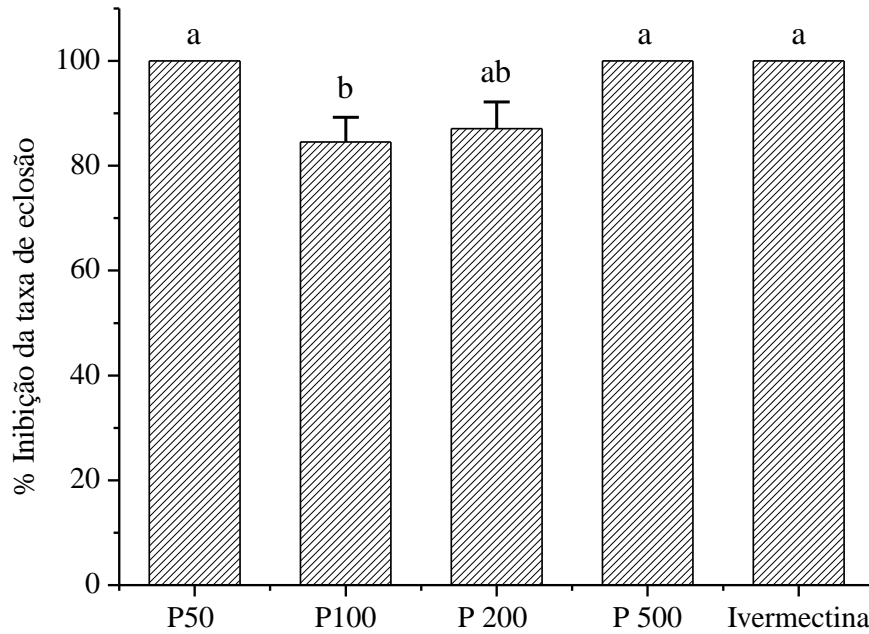


Os cromatogramas foram obtidos utilizando coluna de sílica (250 x 4 mm de diâmetro interno, partículas de 5  $\mu\text{m}$ ). Fase móvel 100% água ultrapura, fluxo de 1 mL/min, 15 °C. Volumes de 50  $\mu\text{L}$  de cada pico (3  $\mu\text{g}$  de proteínas/mL) foram aplicados. **A, B, C e D** – Perfis de P50, P100, P200 e P500, respectivamente. A absorbância (mAU) foi monitorada a 220 nm.

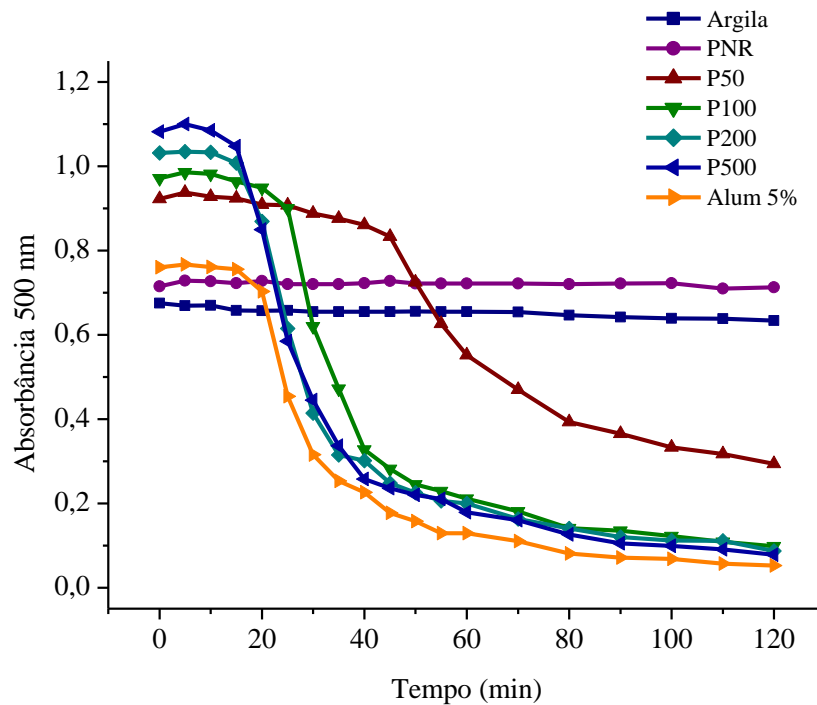


Os cromatogramas foram obtidos utilizando coluna de sílica (250 x 4 mm de diâmetro interno, partículas de 5  $\mu\text{m}$ ). Fase móvel 100% água ultrapura, fluxo de 1 mL/min, 15 °C. Volumes de 50  $\mu\text{L}$  de cada pico (3  $\mu\text{g}$  de proteínas/mL) foram aplicados. **A, B, C e D** – Perfis de P50, P100, P200 e P500, respectivamente. A absorbância (mAU) foi monitorada a 220 nm.

**Figura 18** - Efeito dos picos proteicos obtidos em cromatografia de troca iônica (Source 30S) sobre a taxa de eclosão de ovos de *H. contortus*.



Os diferentes picos proteicos (P50 – P500) em concentração de aproximadamente 3,5 µg de proteínas foram ensaiados em teste *in vitro* de eclosão de ovos com adaptações, onde foram utilizados volumes correspondentes a ¼ dos volumes do teste original. Ivermectina 0,08% foi utilizada como controle positivo. Os valores estão expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Bonferroni.

**Figura 19** - Atividade flocculante dos picos proteicos obtidos em cromatografia de troca iônica (Source 30S).

Amostras de 10  $\mu\text{L}$  contendo aproximadamente 3,5  $\mu\text{g}$  de proteínas foram avaliadas. A absorbância (densidade óptica) foi monitorada a 500 nm por 2 horas. Sulfato de alumínio 5% (Alum 5%) e solução de argila na ausência de amostras foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

**Tabela 4** - Rendimento parcial de proteínas flocculantes/ovicidas obtidas durante o processo de purificação.

Fração	Atividade (unidades)	Atividade específica (Unidades/mg)	Fator de Purificação	Rendimento de atividade (%)
EA	0,93	0,4	1	100
D12	0,75	0,7	1,8	48
D2	0,75	1,76	4,4	40

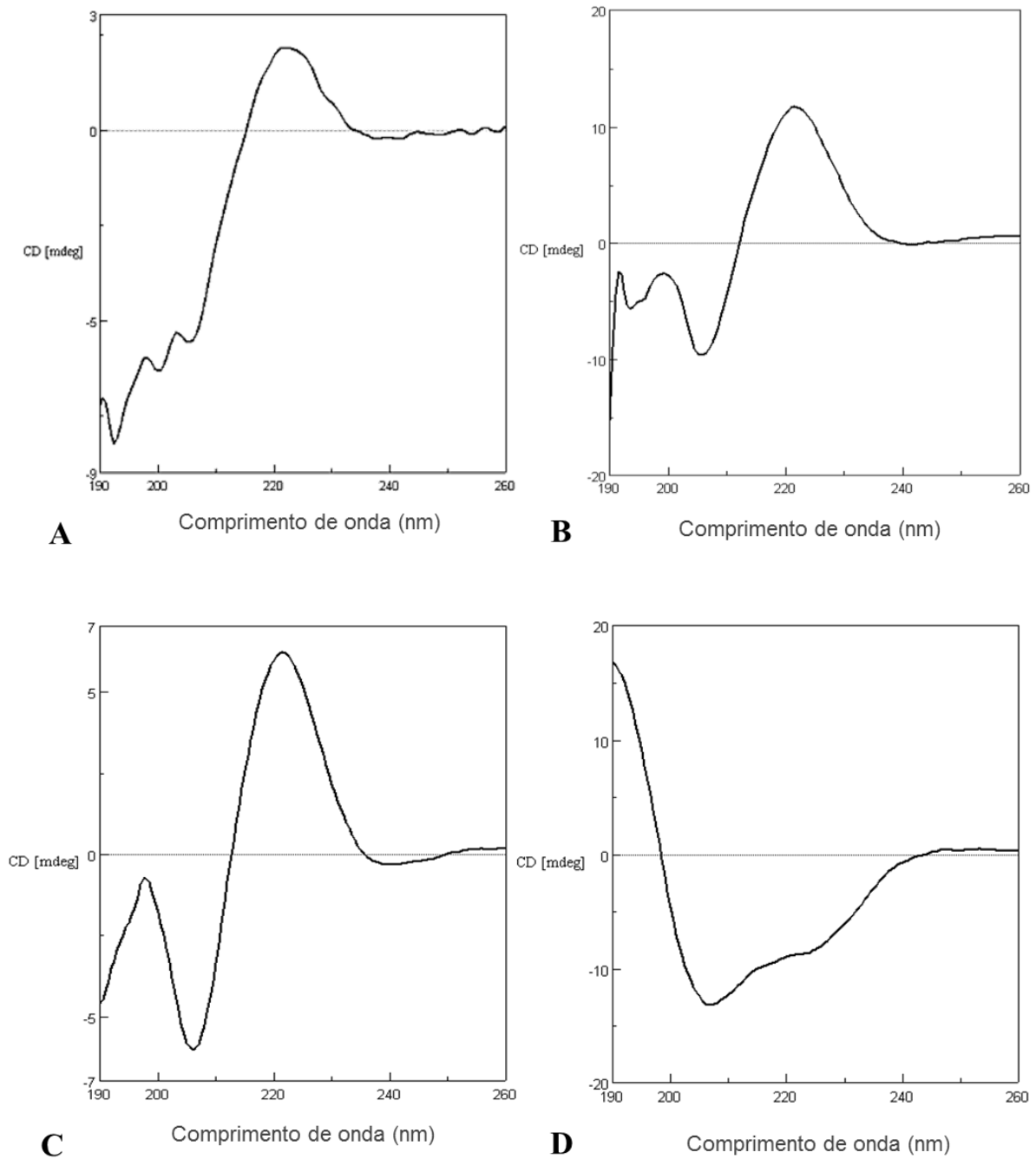
Os valores foram calculados considerando os resultados da atividade flocculante, cujas unidades de atividade são definidas como a diferença entre a turbidez residual do controle negativo ( $RT_{\text{branco}}$ ) e da amostra testada ( $RT_{\text{amostra}}$ ) dividida pela turbidez residual do controle negativo:  $(RT_{\text{branco}} - RT_{\text{amostra}} / RT_{\text{branco}})$ .

## 1 **5.6 Análises espectroscópicas por dicroísmo circular – CD**

2

3 O conteúdo de estrutura secundária para as diferentes isoformas proteicas, aqui  
4 detectadas, foi estimado por medidas de CD no UV distante (190-260 nm). Nas condições  
5 experimentais utilizadas, foi possível evidenciar uma variabilidade de combinações entre  
6 diferentes estruturas conformacionais. Três das quatro isoformas, P50, P100 e P200,  
7 apresentaram espectros típicos de estruturas desordenadas (“random coil”), estes são  
8 caracterizados pela presença de uma banda positiva com máximo em torno de 212 nm e uma  
9 banda negativa com mínimo próximo a 195 nm (**Figura 20A, B e C**). De fato, os referidos  
10 picos proteicos exibiram elevada semelhança quanto às diferentes contribuições estruturais,  
11 onde o predomínio de mais de 70% do conteúdo total foi referente a estruturas randômicas  
12 (**Tabela 5**). Por outro lado, P500 apresentou um padrão espectral bastante diferenciado dos  
13 demais. Para tal amostra, observou-se um espectro formado por mínimos de elipticidade  
14 molar em torno de 208 e 222 nm e um máximo próximo a 190 nm (**Figura 20D**). Tais sinais  
15 obtidos para P500 são típicos de conformações em alfa hélice, cujo tipo conformacional  
16 mostrou-se responsável por aproximadamente 70% do conteúdo estrutural da amostra, sendo  
17 o arranjo total da estrutura secundária complementado, quase que exclusivamente, por  
18 composições não ordenadas (**Tabela 5**).

**Figura 20** - Espectros de dicroísmo circular dos diferentes picos proteicos obtidos em cromatografia de troca iônica (Source 30S).



Amostras (10-15  $\mu\text{g}$  de proteínas/mL) foram diluídas em água ultrapura (1:2). Os dados de CD foram registrados na região do UV-distante (190-260 nm) como média de 8 varreduras a 25 °C para cada solução proteica. **A, B, C** e **D** correspondem aos espectros de CD para P50, P100, P200 e P500, respectivamente.

**Tabela 5** - Elementos de estrutura secundária, estimados a partir de espectros de CD, dos diferentes picos proteicos obtidos em cromatografia de troca iônica (Source 30S).

Picos (Source 30S)	Elementos de Estrutura secundária (%)		
	$\alpha$ -hélice	Cadeias- $\beta$	Estruturas não ordenadas
P50	3,18	18,73	78,09
P100	4,01	24,33	71,66
P200	4,02	25,11	70,87
P500	69,02	0,04	30,94

Predições quantitativas foram realizadas utilizando o servidor online K2D3.

## 1 **5.7 Estudo do modo de ação do efeito ovicida de D2**

2

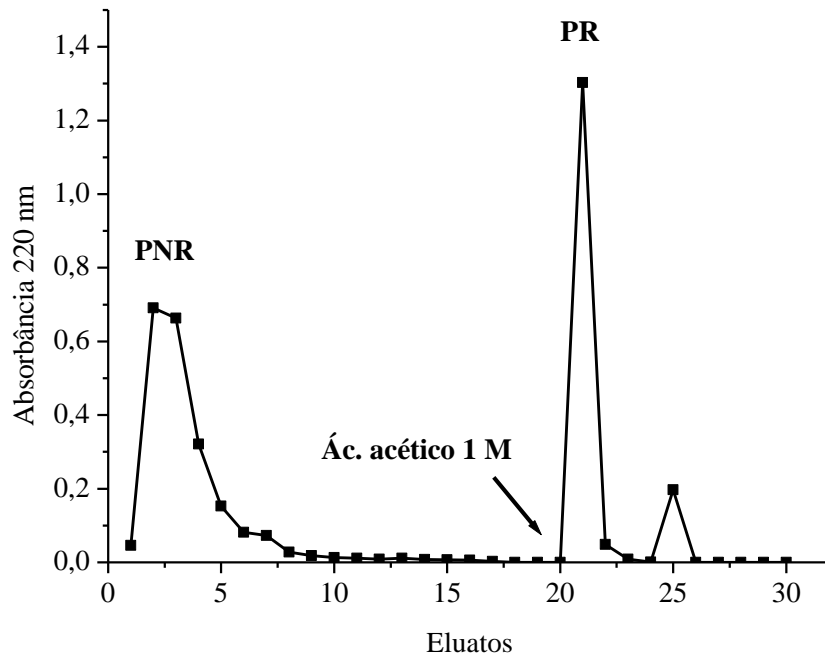
### 3 **5.7.1 Afinidade à quitina**

4

5           Análise cromatográfica em matriz de quitina foi utilizada para avaliar a  
6 capacidade de interação de D2 com o referido polissacarídeo, constituinte das cascas de ovos  
7 de nematódeos (**Figura 21**). Embora tenha sido possível a obtenção de dois picos distintos  
8 referentes a moléculas retidas (PR) e não retidas na matriz (PNR), o ensaio biológico desses  
9 materiais, através do teste de eclosão de ovos, revelou que a atividade ovicida majoritária da  
10 fração, se deve a moléculas que não apresentam afinidade à quitina (**Figura 22**). Portanto,  
11 essa possível via de interação foi descartada.

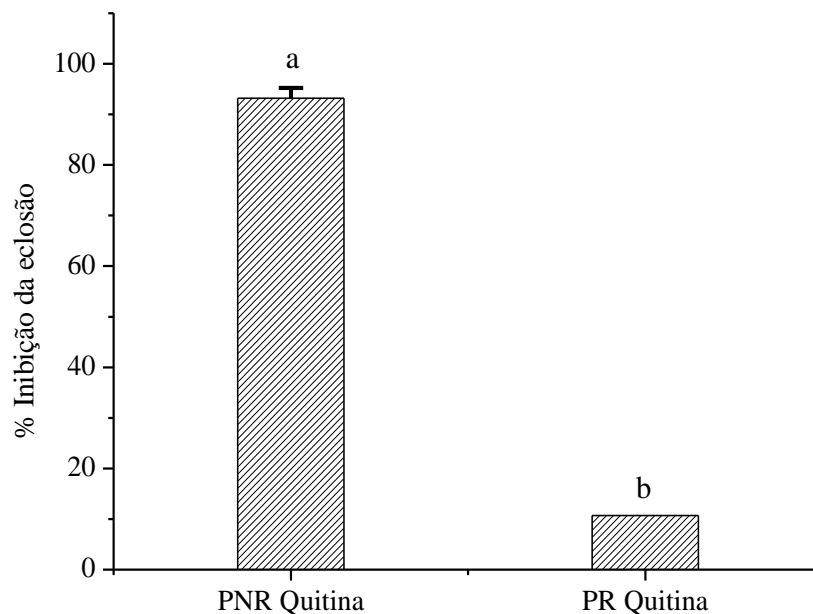


**Figura 21** - Cromatograma de afinidade da fração D2 de *M. oleifera* Lam. em matriz de quitina.



Alíquotas de 2 mL da fração D2 (15 µg/mL) foram aplicadas em coluna de quitina (5 x 1 cm) permanecendo em contato com a matriz por 1 hora antes do início da eluição. **PNR**: Pico não retido eluído com água destilada; **PR**: Pico retido eluído com ácido acético 1 M. Frações de 2 mL foram coletadas em fluxo de 2 mL/min e monitoradas a 220 nm.

**Figura 22** - Efeito dos picos obtidos em cromatografia de afinidade à quitina sobre a taxa de eclosão de ovos de *H. contortus*.



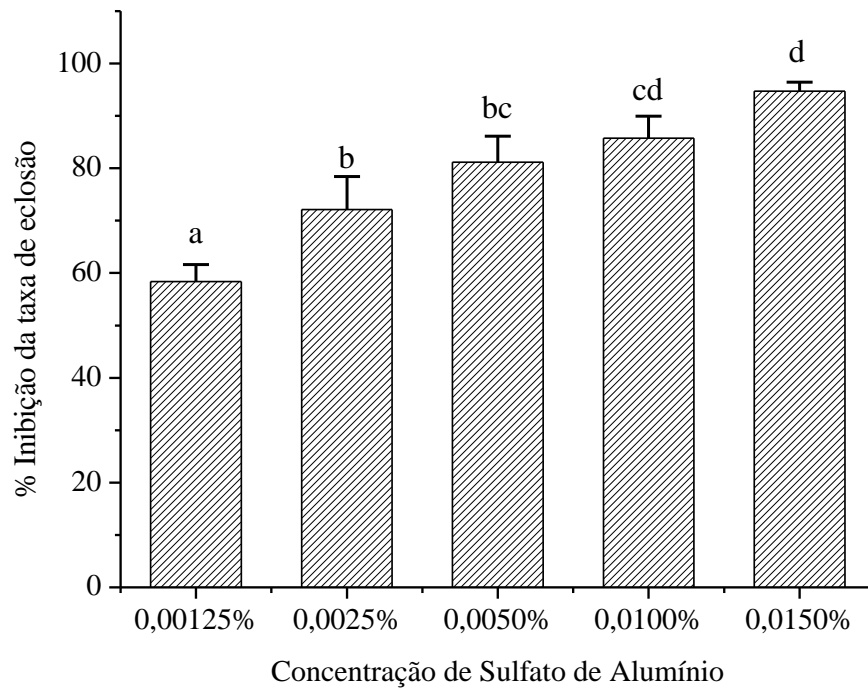
Alíquotas de 400 µL de cada pico (concentração proteica não determinada) foram utilizadas no ensaio. **PNR**: Pico não retido; **PR**: Pico retido. Os valores estão expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Bonferroni.

### 1 **5.7.2 Forças eletrostáticas**

2  
3 Ao ser analisado o comportamento do sulfato de alumínio (composto inorgânico  
4 carregado positivamente) sobre a taxa de eclosão de ovos, resultados semelhantes aos  
5 exibidos por D2 foram observados (**Figura 23**). Surpreendentemente, o composto catiônico  
6 sintético mostrou potente atividade inibitória da eclosão e, assim como em D2, uma forte  
7 relação concentração-dependente foi demonstrada, sendo a concentração máxima utilizada  
8 (0,015%) capaz de inibir em  $94,7 \pm 1,8\%$  a taxa de eclosão de ovos. Embora potenciais  
9 atividades ovicidas tenham sido detectadas em ambas as amostras nenhum efeito  
10 embriotóxico foi observado para as concentrações testadas.

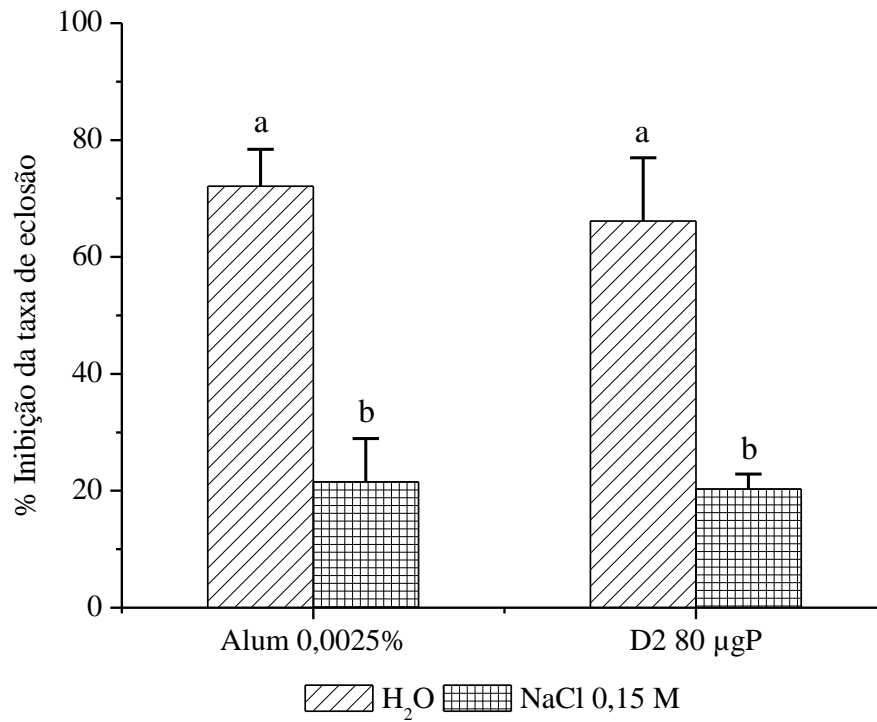
11 A fim de investigar o envolvimento de interações eletrostáticas com a ação ovicida  
12 novas análises foram conduzidas. O comportamento de D2 e do sulfato de alumínio sobre a  
13 eclosão de ovos foi novamente avaliado, porém mediante alteração da força iônica do meio  
14 através da adição de NaCl. Tal modificação nas condições do ensaio consistiu em verificar se  
15 na presença de partículas negativas (representadas aqui por íons  $\text{Cl}^-$ ) uma provável interação  
16 entre moléculas positivas (D2 e sulfato de alumínio) e os ovos seria afetada. A **figura 24**  
17 representa o desempenho das amostras sob as duas condições testadas: em água ou em  
18 solução salina. Nota-se nitidamente que uma significativa inversão do efeito inibitório da  
19 eclosão foi alcançada por ambas as amostras quando estas foram expostas à presença de íons  
20  $\text{Cl}^-$  (NaCl). Esses resultados sugerem que a neutralização das moléculas ativas positivas por  
21 cargas negativas foi, provavelmente, responsável pela redução da atividade ovicida antes  
22 observada.

**Figura 23** - Efeito de diferentes concentrações de sulfato de alumínio sobre a taxa de eclosão de ovos de *H. contortus*.



Ovos de *H. contortus* permaneceram em contato com o agente floculante, sulfato de alumínio, por 24 horas. Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Bonferroni.

**Figura 24** - Efeito inibidor da eclosão por D2 e sulfato de alumínio na presença de cloreto de sódio.



Sulfato de alumínio (Alum) e D2 foram ensaiados em teste *in vitro* de eclosão de ovos encerrando concentrações finais de 0,0025% e 80 µg, respectivamente. Os meios aquosos utilizados nos testes consistiram em solução salina (NaCl 0,15 M) ou apenas água destilada. Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Bonferroni.

## **7 DISCUSSÃO**

1           Avanços científicos e tecnológicos têm acelerado de forma extraordinária o curso da  
2   evolução. A combinação bem sucedida de conceitos compreendidos em biologia, engenharia e  
3   química tem feito da biotecnologia uma ciência moderna capaz de oferecer inúmeras  
4   ferramentas que têm revolucionado as mais diversas áreas, principalmente no que diz respeito  
5   aos benefícios alcançados na área de saúde tanto humana quanto animal (STRYJEWSKA et  
6   al., 2013; EVENS; KAITIN, 2015). O manuseio e o controle de componentes biológicos tem  
7   tornado possível o desenvolvimento de novas técnicas para diagnósticos, prevenção e  
8   tratamento de várias doenças. Assim, a manipulação de micro-organismos, animais e até  
9   mesmo de plantas são vistas, atualmente, como fontes importantes de moléculas para criação  
10   e implementação de produtos com finalidades terapêuticas e preventivas (BANIASAD;  
11   AMOOZGAR, 2015). No entanto, um longo caminho necessita ser percorrido até que um  
12   organismo ou parte deste possa ser convertido em ferramenta biotecnológica.

13           Proteínas estão entre as principais substâncias de interesse para compor produtos  
14   terapêuticos comerciais, uma vez que se tratam de moléculas abundantes, com diversificadas  
15   funções terapêuticas e representam elementos cruciais em todos os processos biológicos,  
16   porém seus tamanhos elevados e alta complexidade inviabilizam técnicas mais simples de  
17   obtenção como as de síntese química, sendo a principal forma de aquisição o isolamento a  
18   partir de fontes naturais ou por técnicas de DNA recombinante (REIS et al., 2009;  
19   BANIASAD; AMOOZGAR, 2015). Já os peptídeos, fragmentos menores de aminoácidos  
20   (massas inferiores a 10 kDa), além de enorme potencial terapêutico destacam-se pela  
21   capacidade em proporcionar produtos mais simples, multifuncionais, seguros, de elevada  
22   eficácia e de fácil obtenção (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015).

23           Inserido em um contexto que visa contribuir com novas estratégias de beneficiamento  
24   e promoção da saúde e bem estar animal, este trabalho foi fundamentado em etapas iniciais  
25   (fase básica) de pesquisas voltadas para detecção de instrumentos biotecnológicos almejando  
26   futuras aplicações no campo da pecuária. A investigação foi conduzida a partir das sementes  
27   de *Moringa oleifera* Lam., uma importante espécie vegetal já explorada por suas  
28   potencialidades medicinais, cujo enfoque central foi dado às moléculas de origem proteica,  
29   procedendo-se com a identificação, caracterização de propriedades bioquímicas e aspectos  
30   estruturais de moléculas que exibiram efeitos ovicidas sobre *Haemonchus contortus*, um  
31   helminto de grande relevância para saúde de pequenos ruminantes e responsável por baixos  
32   índices de aproveitamento produtivo desses animais.

33           Durante a triagem inicial do extrato aquoso (EA) obtido a partir da farinha das  
34   sementes de moringa, foi confirmado que as propriedades ovicidas observadas estavam

1 relacionadas a conteúdos de baixa massa molecular (<12 kDa) e que estes exibiam  
2 determinada concentração proteica ( $0,146 \pm 0,028$  mgP/gF). No entanto, Salles et al. (2014) já  
3 haviam sugerido que a natureza de compostos ativos contra o parasita, presentes nas sementes  
4 de moringa, poderia ser tanto proteica ou ainda relacionada a metabólitos secundários, uma  
5 vez que, o estudo citado avaliou apenas uma fração do EA contendo um “pool” de moléculas  
6 menores que 12 kDa. Diante desse fato, a referida fração de baixa massa também obtida no  
7 presente estudo (sendo aqui denominada de D12) foi submetida a um beneficiamento  
8 adicional por diálise em membrana de *cut off* 2 kDa, cujo resultado evidenciado por HPLC  
9 mostrou alta eficiência em promover a descontaminação do material proteico por compostos  
10 de outra natureza. Dessa forma, o potencial ovicida de moléculas de origem proteica de  
11 moringa pôde ser certificado. Portanto, após confirmar as suspeitas de que mais de uma classe  
12 de compostos estivesse relacionada à ação ovicida investigada, pôde-se afirmar que o efeito  
13 ovicida previamente observado por Salles et al. (2014) tratava-se, na verdade, de uma ação  
14 conjunta de compostos proteicos e não proteicos. Embora a atividade da fração não proteica  
15 (100% de inibição) tenha se sobressaído à da fração proteica ( $82 \pm 1\%$  de inibição), a  
16 descoberta de uma nova espécie vegetal como fonte de peptídeos potencialmente anti-  
17 helmínticos foi um resultado, *per se*, bastante inovador.

18 A relação de compostos de origem proteica, proveniente de vegetais, com atividade  
19 bionemática ainda é restrita. Proteases cisteínicas são os principais compostos proteicos a  
20 serem relatados contra nematoides de interesse da medicina humana e animal, sendo a ação  
21 larvicida, por danos à cutícula, a mais observada (STEPEK et al., 2004; PHIRI et al., 2014),  
22 com poucos relatos para os efeitos ovicidas (DOMINGUES et al., 2013; SOARES et al.,  
23 2015). Por outro lado, proteínas bacterianas respondem pelos bionemáticos mais utilizados  
24 no mundo (HU; AROIAN, 2012).

25 Durante a caracterização da fração proteica ovicida de moringa aqui obtida e  
26 denominada de D2, foi observado um perfil eletroforético inicial com pelo menos duas bandas  
27 proteicas (~18 kDa; ~6,5 kDa). Porém, foi constatado que na presença do agente redutor  $\beta$ -  
28 mercaptoetanol a banda de menor massa tornava-se bem mais evidente, sugerindo assim que a  
29 ocorrência de possíveis ligações dissulfeto poderia ser responsável por associações intra ou  
30 intermoleculares. Diante da impossibilidade de moléculas com massas elevadas (> 12 kDa)  
31 atravessarem os poros das membranas utilizadas nos processos de diálises, foi levantada a  
32 hipótese de que as bandas de alta massa, ali presentes, estariam sendo formadas  
33 aleatoriamente por interações inespecíficas entre as moléculas de massas menores, agora mais  
34 concentradas. A fim de validar a referida hipótese, o comportamento da fração D2 sob

1 condições reduzidas e não reduzidas foi novamente avaliado. Porém, dessa vez partiu-se do  
2 princípio de que agentes redutores de grupos tiol, como  $\beta$ -mercaptoetanol e ditioneitol (DTT),  
3 embora desfaçam ligações dissulfeto intra e intermoleculares e sejam utilizados para alcançar  
4 o desdobramento completo de moléculas proteicas, o DTT é o mais estável desses agentes e  
5 favorece a manutenção das proteínas em seus estados reduzidos (GETZ et al., 1999). Assim,  
6 D2 na ausência e presença de diferentes concentrações do agente redutor DTT (5, 50 e 200  
7 mM) foi novamente analisada. A visualização de uma banda única após condição máxima de  
8 redução (DTT 200 mM) resultou em uma conclusão inicial de que D2 fosse então constituída  
9 por unidades peptídicas de massa molecular aparente em torno de 6,5 kDa e que interações  
10 inespecíficas fortemente estabilizadas por pontes dissulfeto seriam, de fato, responsáveis por  
11 formas oligoméricas observadas nos géis.

12 A obtenção dessas novas informações acerca de D2 contribuiu fortemente para  
13 prosseguir com a caracterização das moléculas. Trabalhos anteriores realizados com sementes  
14 de moringa relatam o isolamento de peptídeos catiônicos com massas entre 6,5 e 7 kDa  
15 (GASSENSCHMIDT et al., 1995) e suas associações em dímeros de ~13 kDa ou tetrâmeros  
16 de ~26 kDa (NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995; SHEBEK et al., 2015)  
17 como eficientes agentes floculantes usados para tratamento de potabilização de águas.  
18 Embora complexos de massas diferentes tenham sido detectados nesse estudo, as semelhanças  
19 entre os resultados para às unidades monoméricas confluíram para a suposição de que  
20 peptídeos floculantes de moringa fossem os mesmos protagonistas do presente estudo, o qual  
21 ineditamente revelou as importantes propriedades ovicidas de tais moléculas. A suspeita tão  
22 logo foi confirmada após ser verificada a intensa capacidade floculante de D2 tanto por suas  
23 formas monoméricas (na presença de DTT) quanto por seus complexos (fração nativa),  
24 corroborando com os resultados de Ndabigengesere et al. (1995) que não observaram  
25 diferenças na atividade floculante de monômeros e dímeros (6,5 e 13 kDa). Estes resultados  
26 propõem que tanto os complexos proteicos de diferentes tamanhos quanto os monômeros de  
27 baixa massa dispõem dos requisitos necessários ao desempenho de suas atividades, seja  
28 floculante ou ovicida.

29 Visto que outras bioatividades inerentes a proteínas, como o potencial inibitório de  
30 proteases, também já tenham sido detectadas em sementes de moringa (SALLES et al., 2014),  
31 uma avaliação da especificidade de D2 por proteases serínicas e cisteínicas foi então  
32 conduzida. Ensaio de inibição enzimática tendo tripsina e papaína como enzimas alvo  
33 revelaram que as duas proteases ensaiadas tiveram suas atividades afetadas negativamente por  
34 D2, sendo a maior ação inibitória ( $99,22 \pm 0,22\%$ ) direcionada a proteases cisteínicas (papaína).



1 Portanto, além das atividades flocculantes e ovicidas já observadas, peptídeos de moringa  
2 também dispõem de notória habilidade para atuarem como inibidores enzimáticos. Vale  
3 ressaltar que esse resultado é de extrema importância, uma vez que, vinculada à ação  
4 terapêutica de proteínas e peptídeos está o grande desafio de torná-los viáveis para uso. A  
5 maior limitação relacionada à biodisponibilidade dessas moléculas, visando administração via  
6 oral, está ligada ao fato de que suas ações são rapidamente suprimidas, principalmente, por  
7 intensa atuação de enzimas proteolíticas presentes no trato digestivo (MELO; CUNHA;  
8 FIALHO, 2012). Logo, o potencial inibitório apresentado, favorece uma possível utilização  
9 dessas moléculas como drogas naturais capazes de serem administradas via oral e sem,  
10 contudo, perderem drasticamente suas funções.

11 Embora exista uma grande variedade de compostos bioativos encontrados em *M.*  
12 *oleifera* Lam., registros de inibidores proteicos para espécie são raros. Folhas e sementes de  
13 moringa são os órgãos apontados como fontes de inibidores (BIJINA et al., 2011a; SALLES  
14 et al., 2014). No entanto, contrariamente aos resultados aqui obtidos, são relatadas moléculas  
15 com atividades direcionadas, principalmente, a proteases serínicas. Bijina et al. (2011)  
16 demonstraram que o extrato de folhas e sementes de moringa exerceram forte efeito inibitório  
17 sobre tripsina (77% e 63%, respectivamente), porém, ao prosseguirem nas análises com os  
18 inibidores encontrados nas folhas registraram menores níveis de inibição da papaína (entre 50  
19 e 60%) e quase nenhum efeito sobre pronase E (mistura de proteases serínicas). O inibidor  
20 isolado das folhas de moringa revelou moléculas apresentando-se como bandas polipeptídicas  
21 únicas de massa molecular em torno de 23 kDa, cuja interação com matriz aniônica (DEAE),  
22 durante as etapas de purificação, sugere que estas sejam moléculas dotadas de cargas  
23 negativas (BIJINA et al., 2011b). Dessa forma, além da nova atribuição como moléculas  
24 ovicidas, os peptídeos purificados e caracterizados neste estudo são também, pela primeira  
25 vez, demonstrados como potenciais inibidores de proteases presentes nas sementes de  
26 moringa.

27 Sabendo que resistência à proteólise é uma importante característica requerida para  
28 moléculas proteicas candidatas a possíveis formulações terapêuticas e que inibidores de  
29 proteases estão dentre as proteínas de defesa vegetal que apresentam como característica  
30 principal a forte estabilidade proteolítica (OLIVEIRA; MACEDO, 2011), D2 foi avaliada  
31 quanto ao seu comportamento frente à hidrólise por proteases serínicas utilizando pronase E.  
32 Mesmo diante da baixa atividade antitripsínica (138 UI/mg) comparada à atividade  
33 antipapainásica (634 UI/mg), o ensaio de digestibilidade *in vitro* mostrou que D2 apresenta  
34 alto grau de resistência à proteólise por proteases serínicas. Mesmo após 24 horas de contato

1 com pronase E os perfis eletroforéticos e cromatográficos (HPLC) de D2 mantiveram-se  
2 inalterados, sugerindo que diferentes características químicas podem contribuir para  
3 manutenção de sua estabilidade.

4 Embora houvesse na literatura diferentes relatos do isolamento dos mesmos prováveis  
5 peptídeos de moringa aqui encontrados, uma intrigante afirmativa feita durante os estudos de  
6 Ghebremichael et al. (2005), de que no extrato aquoso das sementes haveria a presença de  
7 pelo menos quatro moléculas proteicas homólogas, impulsionou as investigações para a  
8 obtenção dessas diferentes isoformas de maneira que pudéssemos constatar algumas  
9 diferenças entre elas e se estas influenciariam em suas funcionalidades.

10 Apesar da afirmativa descrita acima, trabalhos utilizando diferentes combinações de  
11 matrizes cromatográficas catiônicas só descrevem o isolamento de até três isoformas,  
12 denominadas MO 2.1, MO 2.2 e MO 2.3, e que exibem massas moleculares semelhantes  
13 distribuídas por SDS-PAGE (~6,5 kDa). A determinação da estrutura primária de MO 2.1  
14 revelou uma molécula constituída por 60 resíduos de aminoácidos que dispõe de N-terminal  
15 bloqueado (GASSENSCHMIDT et al., 1995; GHEBREMICHAEL et al., 2005).  
16 Recentemente, Shebek et al. (2015) trabalhando com o extrato aquoso das sementes de  
17 moringa descreveu a presença de dímeros provenientes da complexação da isoforma MO 2.1  
18 e tetrâmeros provenientes da complexação das isoformas MO 2.1 e MO 2.2. Dados de  
19 espectrometria de massas mostraram uma diferença em apenas dois resíduos de aminoácidos  
20 de uma isoforma para outra.

21 Todavia, no presente estudo a utilização de uma única etapa cromatográfica em matriz  
22 catiônica (Source 30S) foi capaz de separar a fração proteica multifuncional (D2),  
23 inicialmente obtida por diálise, em quatro amostras proteicas funcionalmente ativas. Estas  
24 também apresentaram massas similares observadas em gel de tricina (~6,5 kDa) além de  
25 perfis cromatográficos (HPLC) idênticos, cujos tempos de retenção coincidem com o  
26 apresentado por D2, onde os diferentes picos certamente se sobrepunham e revelavam-se  
27 como um único pico. Assim, o presente estudo apresentou um método bastante simples e  
28 eficaz para obtenção de peptídeos catiônicos, bem como de suas diferentes isoformas,  
29 presentes no extrato aquoso das sementes de *M. oleifera* Lam. O método resume-se  
30 basicamente em duas etapas de separação por membranas e uma etapa cromatográfica em  
31 coluna de troca iônica.

32 Apesar das semelhanças, a análise acerca do conteúdo de estrutura secundária das  
33 quatro amostras evidenciou algumas diferenças entre as isoformas. Três delas (P50, P100 e  
34 P200) mostraram-se estruturalmente mais relacionadas, pois o padrão conformacional

1 predominante nessas moléculas foi o de estruturas randômicas (aleatórias/desordenadas).  
2 Devido à alta flexibilidade desse tipo de estrutura, diferentes mudanças conformacionais  
3 podem ocorrer, sendo uma importante característica para estes tipos de moléculas. O variado  
4 grau de interação entre os monômeros e a razão da inespecificidade entre as interações  
5 detectadas nesse estudo poderia, inclusive, ser decorrente de tal particularidade. Afinal, o  
6 baixo nível de ordenamento contempla vantagens tais como aumento na velocidade de  
7 interação e habilidade de desempenhar mais do que uma função, isto porque se moldam  
8 facilmente para ligação a diferentes alvos (LOPES; GARCIA; DAMALIO, 2009). Já a quarta  
9 isoforma encontrada, P500, apresentou padrão conformacional distinto, exibindo arranjos em  
10 alfa hélice como conteúdo majoritário. Este resultado é compatível com a predição obtida por  
11 Shebek et al. (2015), através do servidor I-TASSER, para isoforma MO 2.1 que apresentou  
12 estrutura secundária rica em alfa hélice. No entanto, as análises espectroscópicas de dicroísmo  
13 circular aqui realizadas, avaliaram os peptídeos apenas em seus estados livres. Assim,  
14 variações desses dados devem ser consideradas, uma vez que, grandes números de peptídeos  
15 têm a característica de apresentarem-se, em solução livre, como moléculas com pouca ou  
16 nenhuma estrutura definida, porém quando em contato com uma determinada membrana alvo,  
17 dobram-se e podem assumir diferentes conformações estruturais (AVITABILE; D'ANDREA;  
18 ROMANELLI, 2014). Dessa forma, estudos posteriores ainda serão necessários para  
19 esclarecer a relação estrutural dos peptídeos de moringa com suas funções ovicidas.

20 Após breve caracterização da fração proteica D2, foram conduzidos estudos visando  
21 compreender quais mecanismos de interação poderiam estar envolvidos com os efeitos  
22 ovicidas apresentados pela referida mistura proteica. Diante de diferenças entre as isoformas  
23 não afetarem suas atividades, as moléculas foram analisadas em conjunto, superando assim  
24 dificuldades relacionadas ao rendimento final dos peptídeos isolados.

25 Recentemente foi demonstrado que proteínas ligantes à quitina presentes nas sementes  
26 de moringa (Mo-CBP<sub>3</sub> e suas diferentes isoformas), já conhecidas por fortes propriedades  
27 antifúngicas, são importantes membros da família proteica albumina 2S (FREIRE et al.,  
28 2015). O estudo revelou ainda que Mo-CBP<sub>3</sub> é composta por duas cadeias polipeptídicas de,  
29 aproximadamente, 4 e 8 kDa, sendo estas estabilizadas por pontes dissulfeto. Contudo, a  
30 informação mais relevante consistiu no fato de que variantes naturais de peptídeos floculantes  
31 de moringa (Mo2.x) ao serem alinhados com as cadeias de ~8 kDa das isoformas de Mo-  
32 CBP<sub>3</sub>, apresentaram identidade de sequências variando entre 70,6 - 93,1%. Assim, esses  
33 resultados além de sugerirem possíveis precursores para os peptídeos aqui estudados,  
34 forneceram ainda um direcionamento para uma possível via de interação peptídeo/ovo. No

1 entanto, de acordo com os dados obtidos após eluição de D2 em matriz de quitina, foi  
2 observado que as moléculas responsáveis por representativos efeitos ovicidas não  
3 apresentaram interação com o polissacarídeo. Então, considerando a possibilidade das  
4 moléculas em estudo serem derivadas de proteínas ligantes à quitina, essa capacidade de  
5 interação não está relacionada à sequência de resíduos constituintes de tais peptídeos e,  
6 portanto, impossibilitando a atuação dos mesmos por essa via de interação.

7 Outra maneira de investigar o modo de ação ovicida das moléculas foi baseando-se na  
8 correlação funcional de D2 para atividades flocculantes e ovicidas. A constatação dessa  
9 bifuncionalidade foi um resultado extremamente vantajoso em vários aspectos. Primeiro, por  
10 proporcionar um teste *in vitro* fácil, rápido e que requer pequenas quantidades de material  
11 comparadas ao teste de eclosão de ovos. Assim, o ensaio de floculação pode vir a ser sugerido  
12 como teste indireto para “screening” de grandes quantidades de amostras a serem investigadas  
13 quanto suas potencialidades ovicidas. Além disso, o fato de estarmos trabalhando com  
14 moléculas já investigadas anteriormente trouxe-nos a possibilidade de resgatar inúmeras  
15 informações já descritas na literatura, acerca de características peculiares desses peptídeos,  
16 permitindo a especulação de um possível modo de ação no que se refere à interação dessas  
17 moléculas com os ovos de *H. contortus*.

18 A utilização de polieletrólitos sintéticos, por exemplo, é uma prática comum para  
19 tratar e produzir água apta ao consumo, porém algumas desvantagens e os riscos de resíduos  
20 dessas substâncias para saúde têm despertado o interesse pelo uso de compostos orgânicos.  
21 Contudo, uma das importantes características compartilhadas por agentes flocculantes, para  
22 que desempenhem seus papéis, é disporem de uma grande densidade de cargas (BOLTO;  
23 GREGORY, 2007). Estando fundamentada nesse cenário é que *Moringa oleifera* Lam. tem  
24 sido extensivamente explorada pelo grandioso potencial flocculante de suas sementes. Após  
25 muitos estudos foi demonstrado que os principais agentes responsáveis por esta propriedade  
26 são compostos proteicos (peptídeos e lectinas) que compartilham características como alta  
27 estabilidade térmica, além de apresentarem elevados valores de pI, o que lhes proporcionam  
28 alta densidade de cargas positivas (SANTOS et al., 2009; BICHI, 2013). Estas informações  
29 em conjunto com a teoria baseada na neutralização de cargas por interações eletrostáticas, que  
30 explica um dos diferentes tipos de mecanismos de floculação (BOLTO; GREGORY, 2007),  
31 foi crucial para o direcionamento de propostas que ajudassem a compreender o efeito ovicida  
32 também apresentado por estas moléculas.

33 Geralmente, as partículas de impurezas presentes na água apresentam-se carregadas  
34 negativamente e por isso os polieletrólitos catiônicos são utilizados com frequência e

1 mostram-se mais eficazes, sendo o sulfato de alumínio o mais conhecido. Dessa forma,  
2 quando se investigou o comportamento dos polieletrólitos catiônicos, sulfato de alumínio e  
3 D2, compostos inorgânicos e orgânicos, respectivamente, resultados similares foram  
4 observados no que diz respeito ao poder inibitório da taxa de eclosão de ovos. Assim como,  
5 os dois agentes perderam sua eficácia na presença de NaCl. Embora potenciais atividades  
6 ovicidas tenham sido detectadas em ambas as amostras, nenhum efeito embriotóxico foi  
7 observado para as concentrações utilizadas, sugerindo que possíveis interações externas entre  
8 moléculas e ovos estivessem envolvidas no processo.

9 Como já demonstrado por Sengupta et al. (2012), moléculas positivas usadas como  
10 coagulantes podem se ligar à superfície de ovos de helmintos por adsorção, acelerando o  
11 processo de sedimentação e promovendo uma considerável redução dos mesmos em águas  
12 contaminadas. Logo, o mecanismo de interação mais provável para explicar o efeito ovicida,  
13 talvez seja o mesmo utilizado para descrever o processo de floculação e baseia-se no fato de  
14 ovos de helmintos também serem dotados de pequenas cargas de superfície negativas  
15 (SENGUPTA et al., 2012). Assim, os resultados aqui apresentados sugerem que essa  
16 interação entre cargas além de contribuir para os efeitos coagulantes, poderia também ser a  
17 responsável por provocar alterações externas, talvez na casca dos ovos, visto que os embriões,  
18 aparentemente, se desenvolveram normalmente, sendo tal alteração na casca capaz de  
19 inviabilizar o processo natural de liberação das larvas. É evidente que esta suposição se trata  
20 de uma especulação inicial e estudos mais aprofundados fazem-se necessários.

21 Em relação a perspectivas de utilização prática, algumas estratégias já podem ser  
22 vislumbradas. Por exemplo, o uso do próprio extrato aquoso total ou da farinha das sementes  
23 via solo, visando uma descontaminação do ambiente. Em médio prazo essa aplicação pode ser  
24 avaliada considerando as características químicas exibidas pelas moléculas ativas, cuja  
25 caracterização obtida até o momento, acerca dos agentes de natureza proteica, já demonstra  
26 grande robustez das moléculas frente a adversidades bióticas e abióticas (ex: resistência à  
27 proteólise e termoestabilidade, respectivamente). Assim, tolerância a variações de pH e  
28 salinidade são parâmetros importantes a serem investigados. Em longo prazo, a síntese  
29 química desses peptídeos para produção de biofármacos não está descartada, podendo  
30 constituir uma importante e viável estratégia de aplicação.

31 Contudo, os dados obtidos no presente estudo reforçam a enorme capacidade  
32 terapêutica da espécie vegetal *M. oleifera* Lam. e revelam ainda um grupo de moléculas  
33 proteicas multifuncionais, de grande relevância e com potencial para atuarem como futuras  
34 ferramentas biotecnológicas no controle de helmintoses.

## **8 CONCLUSÕES**

1            *Moringa oleifera* Lam. é uma importante fonte de peptídeos catiônicos  
2 multifuncionais. Além da já conhecida potencialidade floculante, as moléculas apresentam  
3 forte atividade inibitória de proteases e potentes efeitos deletérios contra ovos do nematoide  
4 gastrintestinal de pequenos ruminantes, *H. contortus*. A natureza catiônica das moléculas  
5 provavelmente tenha participação essencial nos mecanismos de interação peptídeo/ovo e  
6 sugere uma rota inicial para o desempenho de seus papéis ovicidas.

## REFERÊNCIAS

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

ABE, M. et al. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. Molecular cloning and expression studies. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, n. 3, p. 933–937, 1992.

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.

AHID, S. M. M. et al. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da região oeste do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 212–218, 2008.

AL-ASMARI, A. K. et al. *Moringa oleifera* as an anti-cancer agent against breast and colorectal cancer cell lines. **Plos One**, v. 10, n. 8, p. e0135814, 2015.

ALBERICIO, F.; KRUGER, H. G. Therapeutic Peptides. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 12, p. 1527–1531, 2012.

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**, v. 2015, p. 13, 2015.

ALMEIDA, H. O. Identificação de peptídeos antimicrobianos de folhas de berinjela para o controle de patógenos de plantas. 2007. 128 f. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola)**, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2007.

AMARANTE, A. F. T. ; SALES, R. O. Controle de endoparasitoses dos ovinos: uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 1, n. 2, p. 14–36, 2007.

ARAÚJO, J. V. DE et al. Controle biológico de nematóides gastrintestinais de caprinos em clima semi-árido pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 1, p. 1177–1181, 2007.

ARAÚJO, L. C. C. et al. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. **PLOS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–15, 2013.

AVITABILE, C.; D’ANDREA, L. D.; ROMANELLI, A. Circular Dichroism studies on the interactions of antimicrobial peptides with bacterial cells. **Scientific reports**, v. 4, p. 4293, 2014.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1543–1575, 2013.

BANIASAD, M.; AMOOZGAR, Z. Biotechnology: employing organism as bioreactors. **Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 2, p. 53–64, 2015.

BHATTI, H. N. et al. Removal of Zn(II) ions from aqueous solution using *Moringa oleifera* Lam. (horseradish tree) biomass. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 547–553, 2007.



- 1 BICHI, M. H. A Review of the applications of *Moringa oleifera* seeds extract in water  
2 treatment. **Civil and Environmental Research**, v. 3, n. 8, p. 1–11, 2013.
- 3
- 4 BICHUETTE, M. A. et al. Susceptibility of helminth species parasites of sheep and goats to  
5 different chemical compounds in Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 133, p. 93–101,  
6 2015.
- 7
- 8 BIJINA, B. et al. Protease inhibitor from *Moringa oleifera* with potential for use as  
9 therapeutic drug and as seafood preservative. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, n.  
10 3, p. 273–281, 2011a.
- 11
- 12 BIJINA, B. et al. Protease inhibitor from *Moringa oleifera* leaves: Isolation, purification, and  
13 characterization. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2291–2300, 2011b.
- 14
- 15 BITTENCOURT, C. R. et al. Immobilization of cationic antimicrobial peptides and natural  
16 cashew gum in nanosheet systems for the investigation of anti-leishmanial activity. **Materials  
17 Science and Engineering C**, v. 59, p. 549–555, 2016.
- 18
- 19 BOLTO, B.; GREGORY, J. Organic polyelectrolytes in water treatment. **Water Research**, v.  
20 41, n. 11, p. 2301–2324, 2007.
- 21
- 22 BOWMAN, D. D.; GEORGI, J. R.; LYNN, R. C. **Georgi's Parasitology for Veterinarians**.  
23 8 ed. Saunders Publishing Compan, p.422, 2009.
- 24
- 25 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms  
26 quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical  
27 Biochemistry**, v. 72, p. 248-254. 1976.
- 28
- 29 CÂNDIDO, E. S. et al. The use of versatile plant antimicrobial peptides in agribusiness and  
30 human health. **Peptides**, v. 55, p. 65–78, 2014.
- 31
- 32 CASELANI, K. Resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal.  
33 **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 20, p. 189–197, 2014.
- 34
- 35 CEZAR, A. S.; CATTO, J. B.; BIANCHIN, I. Controle alternativo de nematódeos  
36 gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p.  
37 2083–2091, 2008.
- 38
- 39 CHU, H.-L. et al. Novel antimicrobial peptides with high anticancer activity and selectivity.  
40 **PLoS one**, v. 10, n. 5, p. e0126390, 2015.
- 41
- 42 CLIMENI, S. B. O. et al. Hemoncose ovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina  
43 Veterinária**, v. 11, 2008.
- 44
- 45 COELHO, M. C. S. C. et al. Aspectos sanitários de rebanhos caprinos e ovinos criados em  
46 assentamentos no município de Petrolina-PE. **Revista Semiárido De Visu**, v. 1, p. 32–40,  
47 2011.
- 48
- 49 COINF. Comissão de Inteligência de Mercado. In: SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria  
50 de Produtos para Saúde Animal: o setor. 2014. **Mercado**. Disponível em:

- 1 <<http://www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8>>. Acesso em: 15 dez. 2015.
- 2
- 3 COLES, G. C. C. et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology  
4 (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary  
5 importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, p.35-44. 1992.
- 6
- 7 COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Doenças parasitárias em  
8 ruminantes no semi-árido brasileiro. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 563–  
9 568, 2009.
- 10
- 11 COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses  
12 gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semi-árida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa**  
13 **Veterinaria Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 65–71, 2011.
- 14
- 15 DA CRUZ, D. G. et al. Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from  
16 the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3-4, p. 340–343, 2010.
- 17
- 18 DEVENDRA, B. N. et al. Antimicrobial activity of *Moringa Oleifera* Lam., leaf extract,  
19 against selected bacterial and fungal strains. **International Journal of Pharma and Bio**  
20 **Science**, v. 2, n. 3, p. 13–18, 2011.
- 21
- 22 DOMINGUES, L. F. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the activity of pineapple (*Ananas*  
23 *comosus*) on *Haemonchus contortus* in Santa Inês sheep. **Veterinary parasitology**, v. 197, n.  
24 1-2, p. 263–70, 2013.
- 25
- 26 ENDO, V. T. et al. Prevalência dos helmintos *Haemonchus contortus* e *Oesophagostomum*  
27 *columbianum* em pequenos ruminantes atendidos no setor de Anatomia Patológica – UEM.  
28 **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 1, p. 112–118, 2014.
- 29
- 30 ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two  
31 new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, p.  
32 271-278, 1961.
- 33
- 34 EVENS, R.; KAITIN, K. The Evolution of biotechnology and its impact on health care.  
35 **Health Affairs**, v. 34, n. 2, p. 210-219, 2015.
- 36
- 37 FAHEY, J. W. *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional,  
38 therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. **Trees for Life Journal**, v. 1, p. 1–15, 2005.
- 39
- 40 FARIAS, M. P. O. et al. Avaliação *in vitro* dos efeitos do óleo da semente de *Carapa*  
41 *guianensis* Aubl. sobre larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos e ovinos. **Revista**  
42 **Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 2, p. 220–226, 2010.
- 43
- 44 FERREIRA, P. P. M. et al. *Moringa oleifera*: compostos bioativos e potencialidade  
45 nutricional. **Revista de Nutricao**, v. 21, n. 4, p. 431–437, 2008.
- 46
- 47 FERREIRA, R. S. et al. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble  
48 seed lectin from *Moringa oleifera*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 186-192,  
49 2011.

- 1 FIGUEREDO JÚNIOR, C. A. et al. O mercado da carne de ovinos e caprinos no Nordeste :  
2 avanços e entraves. **In: Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural**, v. 47, p. 15,  
3 2009.
- 4
- 5 FONSECA, Z. A. A. De S. et al. Relação sexual do parasitismo por *Haemonchus contortus*  
6 em Caprinos (*Capra hircus*). **PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**,  
7 v. 5, n. 31, Ed. 178, Art. 1200, p. 1-9, 2011.
- 8
- 9 FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: Current status and future directions.  
10 **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122–128, 2015.
- 11
- 12 FUKUDA, H.; HIGASHIYAMA, T. Diverse functions of plant peptides: Entering a new  
13 phase. **Plant and Cell Physiology**, v. 52, n. 1, p. 1–4, 2011.
- 14
- 15 GALUPPO, M. et al. Administration of 4-(alpha-L-Rhamnosyloxy)-benzyl isothiocyanate  
16 delays disease phenotype in SOD1(G93A) rats: A transgenic model of amyotrophic lateral  
17 sclerosis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 12, 2015.
- 18
- 19 GANGULY, S. Indian ayurvedic and traditional medicinal implications of indigenously  
20 available plants, herbs and fruits: A Review. **International journal of Research in**  
21 **Ayurveda & Pharmacy**, v. 4, n. 4, p. 623–625, 2013.
- 22
- 23 GASSENSCHMIDT, U. et al. Isolation and characterization of a flocculating protein from  
24 *Moringa oleifera* Lam. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1243, n. 3, p. 477–481, 1995.
- 25
- 26 GCULA (**Guide for the Care and Use of Laboratory Animal**). Institute of Laboratory  
27 Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, National  
28 Academy Press, Washington, D.C., USA (1996).  
29 <http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>
- 30
- 31 GETZ, E. B. et al. A Comparison between the sulfhydryl reductants Tris(2-carboxyethyl)  
32 phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. **Analytical Biochemistry**, v.  
33 273, n. 1, p. 73–80, 1999.
- 34
- 35 GHEBREMICHAEL, K. A. et al. A simple purification and activity assay of the coagulant  
36 protein from *Moringa oleifera* seed. **Water research**, v. 39, n. 11, p. 2338–44, 2005.
- 37
- 38 GIFONI, J. M. et al. A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential  
39 for plant disease control. **Biopolymers**, v. 98, p. 406-415, 2012.
- 40
- 41 GIRI, I. C. et al. Evaluation of the anthelmintic activity of *Moringa Oleifera* seeds.  
42 **International Journal of Pharma Professional's Research Short**, v. 1, n. 1, p. 78–80,  
43 2010.
- 44
- 45 GOUVEIA, A. M. G.; GUIMARÃES, A. S. Defesa sanitária e manejo sanitário e a  
46 viabilidade de programas sanitários oficiais para caprinos e ovinos. **Revista Cabra e Ovelha**,  
47 v. 41, n. 79, p. 5–7, 2013.
- 48
- 49 HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J. F. J. Non chemical control of helminths in ruminants:  
50 Adapting solutions for changing worms in a changing world. **Veterinary Parasitology**, v.

- 1 180, n. 1–2, p. 144–154, 2011.
- 2
- 3 HU, Y.; AROIAN, R. V. Bacterial pore-forming proteins as anthelmintics. **Invertebrate**
- 4 **Neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 37–41, 2012.
- 5
- 6 HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A new method for culture of larvae used in diagnosis of
- 7 ruminant gastrointestinal strongylosis: comparison with fecal cultures. **Canadian Journal of**
- 8 **Comparative Medicine**, v. 48, p. 63–71, 1984.
- 9
- 10 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Sistema IBGE de**
- 11 **Recuperação Automática - SIDRA**. Pesquisa Pecuária Municipal 2014. Disponível em:
- 12 <http://www.sidra.ibge.gov.br/> Acesso em: 15 dez. 2015.
- 13
- 14 KATSIR, L. et al. Peptide signaling in plant development. **Current Biology**, v. 21, n. 9, p.
- 15 R356–R364, 2011.
- 16
- 17 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4.
- 18 **Nature**, v.227, p.680-685. 1970.
- 19
- 20 LAKSHMINARAYANAN, R. et al. Synthetic multivalent antifungal peptides effective
- 21 against fungi. v. 9, n. 2, p. e87730, 2014.
- 22
- 23 LEONE, A. et al. Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and
- 24 pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: An Overview. **International Journal of**
- 25 **Molecular Sciences**, v. 16, p. 12791–12835, 2015.
- 26
- 27 LOPES, J. L. DE S.; GARCIA, A. F.; DAMALIO, J. C. P. **Estudos estruturais e funcionais**
- 28 **de proteínas**. Brasília-DF, 2009. (Nota técnica).
- 29
- 30 LOUIS-JEUNE, C.; ANDRADE-NAVARRO, M. A.; PEREZ-IRATXETA, C. Prediction of
- 31 protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra.
- 32 **Proteins**, v. 80, p. 374–381, 2011.
- 33
- 34 LUZ, S. DE M. Prospecção de moléculas químicas com propriedades alelopáticas em *Acacia*
- 35 *mangium* (Willd.). 2009. 99 f. **Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)** - Nucleo de
- 36 Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Pará, Belém. 2009.
- 37
- 38 MACEDO, I. T. F. et al. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus*
- 39 *globulus* sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.
- 40 18, n. 03, p. 62–66, 2009.
- 41
- 42 MAHMOOD, K. T.; MUGAL, T.; HAQ, I. U. *Moringa oleifera*: A natural gift - A review.
- 43 **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 11, p. 775–781, 2010.
- 44
- 45 MALANOVIC, N.; LOHNER, K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the
- 46 activity of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 11, 2015.
- 47
- 48 MANSFIELD, L. S.; GAMBLE, H. R.; FETTERER, R. H. Characterization of the eggshell of
- 49 *Haemonchus Contortus*-I. Structural components. **Comparative Biochemistry and**
- 50 **Physiology**, v. 103, n. 3, p. 681–686, 1992.

- 1 MDIC- Ministerio do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior; ARCO - Associação  
2 Brasileira de Criadores de Ovinos. **Estudo de mercado externo de produtos derivados da**  
3 **ovinocaprinocultura**. Passo Fundo: Méritos, 2010. 168 p.
- 4
- 5 MELO, S.; CUNHA, S.; FIALHO, S. L. Formas farmacêuticas poliméricas para a  
6 administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. **Journal of Basic and Applied**  
7 **Pharmaceutical Sciences**, v. 33, n. 4, p. 469–477, 2012.
- 8
- 9 MINHO, A. P. Endoparasitoses de ovinos: Conhecer para combater. **Embrapa Pecuária Sul**,  
10 v. 45, n. 1, p. 19, 2014.
- 11
- 12 MOLENTO, M. B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de**  
13 **Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 82–87, 2004.
- 14
- 15 MONTEIRO, M. V. B.; BEVILAQUA, C. M. L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.  
16 Metodologia aplicada a levantamentos etnoveterinários. **Veterinária em Foco**, v. 9, n. 1, p.  
17 76–87, 2011.
- 18
- 19 MOYO, B. et al. Polyphenolic content and antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaf  
20 extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with *Moringa oleifera*  
21 leaves/sunflower seed cake. **Meat Science**, v. 91, n. 4, p. 441–447, 2012.
- 22
- 23 MOYO, B.; MASIKA, P. J.; MUCHENJE, V. Effect of feeding moringa (*Moringa oleifera*)  
24 leaf meal on the physico-chemical characteristics and sensory properties of goat meat. **South**  
25 **African Journal of Animal Science**, v. 44, n. 1, p. 65–70, 2014.
- 26
- 27 NANDAVE, M. et al. *Moringa oleifera* leaf extract prevents isoproterenol-induced  
28 myocardial damage in rats: Evidence for an antioxidant, antiperoxidative, and  
29 cardioprotective intervention. **Journal of medicinal food**, v. 12, n. 1, p. 47–55, 2009.
- 30
- 31 NAVIE, S.; CSURHES, S. Weed risk assessment: *Moringa oleifera*. **Department of**  
32 **Employment, Economic Development and Innovation**, n. 46, p. 26, 2010.
- 33
- 34 NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K. S.; TALBOT, B. G. Active agents and  
35 mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. **Water Research**, v. 29,  
36 n. 2, p. 703–710, 1995.
- 37
- 38 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5 ed. New York:  
39 W.H. Freeman, 2008.
- 40
- 41 NERY, P. S.; DUARTE, E. R.; MARTINS, E. R. Eficácia de plantas para o controle de  
42 nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes: Revisão de estudos publicados. **Revista**  
43 **Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 330–338, 2009.
- 44
- 45 NEVES, M. R. M. DAS; VIEIRA, L. DA S.; ANDRIOL, A. Controle do parasitismo em  
46 cabras leiteiras criadas a pasto. **Embrapa Caprinos e Ovinos**, v. 38, n. 1, p. 6, 2008.
- 47
- 48 NILANI, P. et al. Anthelmintic activity of *Moringa Oleifera* seed oil - Validation of  
49 traditional use. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 3, n. 2, p. 65–66, 2012.

- 1 NOUMAN, W. et al. Potential of *Moringa oleifera* L. as livestock fodder crop: A review.  
2 **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 38, n. 1, p. 1–14, 2014.  
3
- 4 OKUDA, T. et al. Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera*  
5 seed by salt solution. **Water Research**, v. 35, n. 2, p. 405–410, 2001.  
6
- 7 OLIVEIRA, C. F. R. DE; MACEDO, M. L. R. Emprego de inibidores de protease vegetais  
8 como ferramenta biotecnológica alternativa no controle de pragas. **Perspectivas online**, v. 1,  
9 n. 1, p. 1–11, 2011.  
10
- 11 OLIVEIRA, L. D. R. DE. Plantas medicinais como alternativa para o controle de  
12 *Haemonchus contortus* em ovinos: testes *in vitro* e *in vivo*. 2013. 73 f. **Dissertação**  
13 **(Mestrado em Ciências Animais)** - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária,  
14 Universidade de Brasília, Brasília. 2013.  
15
- 16 PACHECO-SILVA, É.; SOUZA, J. R. DE; CALDAS, E. D. Resíduos de medicamentos  
17 veterinários em leite e ovos. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 111–122, 2014.  
18
- 19 PALIWAL, R.; SHARMA, V. A review on horse radish tree (*Moringa oleifera*): A  
20 multipurpose tree with high economic and commercial importance. **Asian Journal of**  
21 **Biotechnology**, v. 3, p. 317–328, 2011.  
22
- 23 PARVATHY, M. V. S.; UMAMAHESHWARI, A. Cytotoxic effect of *Moringa oleifera* leaf  
24 extracts on human multiple myeloma cell lines. **Trends in Medical Research**, v. 1, p. 44-50,  
25 2007.  
26
- 27 PATEL, P. et al. Phytochemical analysis and antifungal activity of *Moringa Oleifera*.  
28 **Internacional Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 5, p. 144–147, 2014.  
29
- 30 PEREIRA, M.L. et al. Purification of a chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds  
31 with potential to relieve pain and inflammation. **Protein and Peptide Letters**, v. 18, p. 1078-  
32 1085, 2011.  
33
- 34 PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. D. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios  
35 antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146–152, 2012.  
36
- 37 PHIRI, A. M. et al. Developing a rapid throughput screen for detection of nematicidal activity  
38 of plant cysteine proteinases: the role of *Caenorhabditis elegans* cystatins. **Parasitology**, v.  
39 141, n. 2, p. 164–80, 2014.  
40
- 41 PICCHI, D. G. et al. Peptídeos cíclicos de biomassa vegetal: Características, diversidade,  
42 biossíntese e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1262–1277, 2009.  
43
- 44 PIMENTEL, V. P. et al. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma  
45 nova esperança? **Revista do BNDES**, n. 43, p. 41–89, 2015.  
46
- 47 PINTO, M. S. T.; RIBEIRO, J. M.; OLIVEIRA, E. A. G. O estudo de genes e proteínas de  
48 defesa em plantas. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 9, p. 241–248, 2011.  
49
- 50 PORTO, L. L. D. M. A.; SALUM, W. B.; ALVES, C. Caracterização da ovinocaprinocultura

- 1 de corte na região do centro Norte Baiano. **Revista Brasileira de Gestao e Desenvolvimento**  
2 **Regional**, v. 9, n. 1, p. 281–296, 2013.
- 3
- 4 RAMACHANDRAN, C.; PETER, K. V.; GOPALAKRISHNAN, P. K. Drumstick (*Moringa*  
5 *oleifera*): A Multipurpose indian vegetable. **Economic Botany**, v. 34, n. 3, p. 276–283,  
6 1980.
- 7
- 8 REIS, C. et al. Biotecnologia para saúde humana: Tecnologias, aplicações e inserção na  
9 indústria farmacêutica. **BNDES Setorial**, v. 29, p. 359–392, 2009.
- 10
- 11 RÍOS-DE ÁLVAREZ, L. et al. Direct anthelmintic and immunostimulatory effects of oral  
12 dosing semi-purified phytohaemagglutinin lectin in sheep infected with *Teladorsagia*  
13 *circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 1-2, p.  
14 267–274, 2012.
- 15
- 16 ROCHA, T. S. et al. Germination of *Phaseolus vulgaris* and alcalase hydrolysis of its proteins  
17 produced bioactive peptides capable of improving markers related to type-2 diabetes *in vitro*.  
18 **Food Research International**, v. 76, n. P1, p. 150–159, 2015.
- 19
- 20 SADDIQI, H. A. et al. Contrasting views of animal healthcare providers on worm control  
21 practices for sheep and goats in an arid environment. **Parasite**, v. 19, n. 1, p. 53–61, 2012.
- 22
- 23 SALLES, H. O. et al. Lectin , hemolysin and protease inhibitors in seed fractions with  
24 ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. **Brazilian journal of veterinary**  
25 **parasitology**, v. 23, n. 2, p. 136–143, 2014.
- 26
- 27 SANTOS, A F. S. et al. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from  
28 *Moringa oleifera* seeds. **Water research**, v. 39, n. 6, p. 975–80, 2005.
- 29
- 30 SANTOS, A. F. S. et al. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process**  
31 **Biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 504–508, 2009.
- 32
- 33 SANTOS, T. C.; ALFARO, C. E. P.; FIGUEIREDO, S. M. Aspectos sanitários e de manejo  
34 em criações de caprinos e ovinos na microrregião de patos, região semi-árida da Paraíba.  
35 **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 2, p. 206–212, 2011.
- 36
- 37 SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel  
38 electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical**  
39 **Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368–379, 1987.
- 40
- 41 SCZESNY-MORAES, E. A. et al. Resistência anti-helmíntica de nematóides gastrintestinais  
42 em ovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 229–236,  
43 2010.
- 44
- 45 SENGUPTA, M. E. et al. Use of *Moringa oleifera* seed extracts to reduce helminth egg  
46 numbers and turbidity in irrigation water. **Water Research**, v. 46, n. 11, p. 3646–3656, 2012.
- 47
- 48 SHEBEK, K. et al. The flocculating cationic polypeptide from *Moringa oleifera* seeds damages  
49 bacterial cell membranes by causing membrane fusion. **Langmuir**, v. 31, n. 15, p. 4496–  
50 4502, 2015.

- 1 SILVA, C. M. B. A. *Enfermidades de pequenos ruminantes e avaliação do manejo de rebanho*  
2 *caprino e ovino na microrregião do Brejo Paraibano*. 2014. 72 f. **Dissertação (Mestrado em**  
3 **Medicina Veterinária)** - Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de  
4 Campina Grande , Patos. 2014.
- 5
- 6 SILVA, W. M. O. DA et al. *Uso popular de plantas medicinais na promoção da saúde animal*  
7 *em assentamentos rurais de Seropédica – RJ*. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**,  
8 v. 20, n. 1, p. 32–36, 2013.
- 9
- 10 SILVA, M. B. *Haemonchus Contortus* de cordeiras Santa Inês, Ile de France e de cordeiras  
11 produtos do cruzamento entre a raça Santa Inês e as raças Dorper , Ile de France , Suffolk e  
12 Texel. 2010. 97 f. **Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada)** - Instituto de  
13 Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2010.
- 14
- 15 SOARES, A. M. DOS S. et al. Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* protein  
16 extracts on *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24,  
17 n. 4, p. 396–401, 2015.
- 18
- 19 SOUSA, R. G. et al. *Atividade anti-helmíntica de plantas nativas do continente americano:*  
20 *Uma revisão*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 287–292, 2013.
- 21
- 22 STEPEK, G. et al. *Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics?* **Trends in**  
23 **Parasitology**, v. 20, n. 7, p. 322–327, 2004.
- 24
- 25 STRYJEWSKA, A. et al. *Biotechnology and genetic engineering in the new drug*  
26 *development. Part III. Biocatalysis, metabolic engineering and molecular modelling*.  
27 **Pharmacological reports**, v. 65, n. 5, p. 1102–11, 2013.
- 28
- 29 SUTEKY, T.; DWATMADJI. *Anthelmintic activity of Melastoma malabatricum extract on*  
30 *Haemonchus contortus activity in vitro*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical**  
31 **Research**, v. 4, n. 1, p. 68–70, 2011.
- 32
- 33 TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. **Parasitologia veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro:  
34 Guanabara-Koogan, 2010.
- 35
- 36 TAYO, G. M. et al. *Anthelmintic activity of Moringa oleifera leaf extracts evaluated in vitro*  
37 *on four developmental stages of Haemonchus contortus from goats*. **American Journal of**  
38 **Plant Sciences**, v. 5, n. 11, p. 1702–1710, 2014.
- 39
- 40 TORRES-ACOSTA, J. F. J. et al. *Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the*  
41 *situation in the American continent*. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 1, p. 89–96, 2012.
- 42
- 43 TORRES-ACOSTA, J. F. J.; HOSTE, H. *Alternative or improved methods to limit gastro-*  
44 *intestinal parasitism in grazing sheep and goats*. **Small Ruminant Research**, v. 77, n. 2–3, p.  
45 159–173, 2008.
- 46
- 47 VANCOMPERNOLLE, S. et al. *Inhibition of HIV infection by caerin 1 antimicrobial*  
48 *peptides*. **Peptides**, v. 71, p. 296–303, 2015.
- 49
- 50 VIEIRA, L. D. S. *Importância das endoparasitoses gastrintestinais nas explorações de*



- 1 caprinos e ovinos. **Embrapa Caprinos e Ovinos**, v. 53, n. 1, p. 32, 2005.
- 2
- 3 VIEIRA, L. da S.; CAVALCANTE, A. C. R.; XIMENES, L. J. F. Epidemiologia e controle  
4 das principais parasitoses de caprinos nas regiões semi-áridas do Nordeste do Brasil. Sobral:  
5 Embrapa- CNPC; São Paulo: Merrial, 1997. 50 p.
- 6
- 7 VILLARROEL, A. Internal parasites in sheep and goats. Extension veterinarian, Oregon State  
8 University, p. 1–4, 2013.
- 9
- 10 WILMSEN, M. O. Epidemiologia das infecções por nematódeos gastrintestinais em ovinos  
11 criados em botucatu. 2014. 91 f. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** -  
12 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.  
13 2014.
- 14
- 15 ZEN, S. DE; SANTOS, M. C. DOS; MONTEIRO, C. M. Evolução da caprino e ovinocultura.  
16 **Ativos da pecuária de caprino e ovinocultura**, ed. 1, p. 8–11, 2014.

**APÊNDICE A – SUBMISSÃO DO MANUSCRITO****Periódico: PLOS ONE****Fator de impacto: 3,234****Qualis A2 (Ciências Biológicas II)****Ovicidal Peptides from *Moringa oleifera* Lamarck: A New Therapeutic Perspective for Control of Parasites in Small Ruminants**

Ana Márjory Paiva Sousa<sup>1¶</sup>, Ana Carolina Linhares Braga<sup>2,#a</sup>, Hévila Oliveira Salles<sup>3¶, &</sup>,  
Lúcia Betânia da Silva Andrade<sup>4</sup>, Hermógenes David de Oliveira<sup>1&\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>2</sup> Higher Institute for Applied Theology (INTA), Sobral, Ceará, Brazil

<sup>3</sup> EMBRAPA Goats and sheep, Sobral, Ceará, Brazil

<sup>4</sup> Department of Biology, Science Center, Acaraú Valley State University, Sobral, Ceará, Brazil

<sup>#a</sup> Department of Biotechnology, Federal University of Ceará, Sobral, Ceará, Brazil

\* Corresponding author

E-mail: hermogenes@ufc.br (HDO)

¶ These authors contributed equally to this work.

& These authors also contributed equally to this work.

#a First Current address.