

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
NÍVEL DE MESTRADO

**Potencial anti-helmíntico de extratos proteicos de
Leucaena leucocephala (Linn.) (Fabaceae) e *Spigelia
anthelmia* (Linn.) (Loganiaceae) contra *Haemonchus
contortus* (Rudolphi, 1803)**

Sandra Alves de Araújo

São Luís, MA

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
NÍVEL DE MESTRADO

Potencial anti-helmíntico de extratos proteicos de *Leucaena leucocephala* (Linn.) (Fabaceae) e *Spigelia anthelmia* (Linn.) (Loganiaceae) contra *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803)

SANDRA ALVES DE ARAÚJO

Orientadora: Prof^a. Dra. Alexandra Martins dos Santos Soares

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

São Luís, MA

2017

Alves de Araújo, Sandra.

Potencial anti-helmíntico de extratos proteicos de *Leucaena leucocephala* (Linn.) (Fabaceae) e *Spigelia anthelmia* (Linn.) (Loganiaceae) contra *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803)
/ Sandra Alves de Araújo. - 2017.

94 p.

Orientador(a): Alexandra Martins dos Santos Soares.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 2017.

1. Nematóide. 2. Controle alternativo. 3. Proteínas vegetais.
4. Pecuária. I. Martins dos Santos Soares, Alexandra. II. Título.

SANDRA ALVES DE ARAÚJO

Potencial anti-helmíntico de extratos proteicos de *Leucaena leucocephala* (Linn.) (Fabaceae) e *Spigelia anthelmia* (Linn.) (Loganiaceae) contra *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803)

A Comissão julgadora do trabalho de dissertação de mestrado, em sessão pública realizada em 04/04/2017, considera a candidata **aprovada**.

Prof^ª. Dra. Alexandra M. dos Santos Soares
Doutorado em Biotecnologia - Orientadora
Universidade Federal do Maranhão

Prof^º. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira
Doutorado em Bioquímica
Universidade Federal do Ceará

Prof^ª. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos
Doutorado em Imunologia
Universidade Federal do Maranhão

Prof^ª. Dra. Denise Fernandes Coutinho Moraes
Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal do Maranhão

DEDICATÓRIA

À Euza Roque Alves (*in memoriam*) e

Luzia Campos de Araújo (*in memoriam*).

“A saudade é grande, mas o amor é para sempre!”

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus;

Aos meus pais Vânia Roque Alves e Antônio Campos de Araújo, às minhas irmãs Susy Alves de Araújo e Suzane Alves de Araújo e minha sobrinha Yasmin Araújo de Souza;

À professora Dra. Alexandra Martins dos Santos Soares, pela orientação deste trabalho;

Ao professor Dr. Livio Martins Costa Júnior;

À professora Dra. Cláudia Quintino da Rocha;

Ao professor Dr. Eduardo Bezerra de Almeida Júnior;

Aos pesquisadores da FIOCRUZ, Dr. André Teixeira da Silva Ferreira e Dr. Jonas Perales;

Ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS);

À coordenadora do PPGCS, Flávia Raquel Fernandes do Nascimento;

Aos colegas da turma de mestrado 2015/2017;

Aos meus colegas e companheiros do Laboratório de Bioquímica Vegetal e do Laboratório de Controle de Parasitos;

Às minhas amigas Lêdia Feitosa Wanderley, Jordânia Araújo de Meneses Fernandes, Marilene da Costa Sousa, Karla Lílian Rodrigues Batista e Helen Silva Ribeiro;

À CAPES, pela concessão de bolsa;

À FAPEMA, pelo suporte financeiro.

OBRIGADA!

“Se você só estiver disposto a realizar o que é fácil, a vida será difícil. Mas, se concordar em fazer o que é difícil, a vida será fácil.”

T. Harv Eker

SUMÁRIO

Pág.

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 <i>Haemonchus contortus</i> (RUDOLPHI, 1803).....	20
2.2 Ciclo de vida do <i>H. contortus</i> e hemoncose.....	21
2.3 Controle de nematoides gastrintestinais e resistência anti-helmíntica	23
2.4 Plantas no controle de nematoides gastrintestinais	24
2.4.1 <i>Leucaena leucocephala</i> (Linn.).....	26
2.4.2 <i>Spigelia anthelmia</i> (Linn.).....	27
2.5 Proteínas vegetais potenciais para o controle de <i>H. contortus</i>	28
2.5.1 Proteases.....	28
2.5.2 Inibidores de protease	29
2.5.3 Quitinases	30
2.5.4 Lectinas	31
3. OBJETIVOS	33
3.1 Geral	33
3.2 Específicos	33

CAPÍTULO 1: Atividade anti-helmíntica de extratos proteicos de *Leucaena leucocephala* sobre *Haemonchus contortus*

Resumo.....	36
1. INTRODUÇÃO.....	37
2. MÉTODOS	38
2.1 Material vegetal	38
2.2 Extração e quantificação das proteínas	39
2.3 Ensaio de atividade protease, inibitória de protease e quitinase	39
2.4 Ensaio biológico	40
2.4.1 Obtenção dos nematoides.....	40

2.4.2 Ensaio de eclosão de ovos.....	40
2.4.3 Ensaio de desembainhamento larvar.....	40
2.5. Análise estatística	41
3. RESULTADOS	41
3.1 Teor de proteína, protease, inibidor de protease e quitinase dos extratos proteicos de <i>L. leucocephala</i>	41
3.2 Atividade biológica sobre <i>H. contortus</i>	41
4. DISCUSSÃO	42
5. Agradecimentos	44
6. REFERÊNCIAS	44

CAPÍTULO 2: Efeito anti-helmíntico *in vitro* de frações proteicas de *Spigelia anthelmia* sobre *Haemonchus contortus*

Resumo.....	52
1. INTRODUÇÃO	53
2. MATERIAIS E MÉTODOS	54
2.1 Material vegetal	54
2.2 Preparação dos extratos e frações proteicas de <i>S. anthelmia</i>	54
2.3 Teor proteico e atividade de protease, inibidor de protease, quitinase e lectina das frações proteicas de <i>S. anthelmia</i>	55
2.4 Ensaio biológicos	55
2.4.1 Obtenção dos nematoides.....	55
2.4.2 Ensaio de eclodibilidade de ovos (EHA).....	56
2.4.3 Ensaio de desembainhamento larvar (LEA)	56
2.4.4 Ensaio de inibição da migração larvar (LMIA).....	57
2.5 Análise da proteômica (ESI-LE-MS/MS).....	57
2.6 Análise qualitativa de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-UV).....	58
2.7 Análise estatística	58

3. RESULTADOS	59
3.1 Teor proteico e atividade de proteína relacionada à defesa de plantas nas frações.....	59
3.2 Identificação das proteínas nas frações.....	59
3.3 Ensaio <i>in vitro</i> contra <i>H. contortus</i>	59
4. DISCUSSÃO	60
5. Agradecimentos.....	63
5. REFERÊNCIAS.....	63
Material suplementar.....	71
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

- ANOVA – Análise de variância
- BSA – Albumina sérica bovina (do inglês, Bovine Serum Albumin)
- BANA – Benzoyl-DL-arginina- β -naphthylamida
- CE – Extrato de cotilédone (do inglês, cotyledon extract)
- EC₅₀ – Concentração efetiva para 50% da população
- IC – Intervalo de confiança
- L₁ – Larva de primeiro estágio
- L₂ – Larva de segundo estágio
- L₃ – Larva de terceiro estágio
- L₄ – Larva de quarto estágio
- L₅ – Larva de quinto estágio
- LPF – Fração proteica folha (do inglês, leaf protein fraction)
- NAG – N-acetyl-d-glucosamina
- nKat – NanoKatal
- PBS – Tampão fosfato de sódio
- PVPP – Polivinilpolipirrolidona
- RPF – Fração proteica raiz (do inglês, root protein fraction)
- SE – Extrato de casca (do inglês, shell extract)
- SPF – Fração proteica caule (do inglês, stem protein fraction)
- TE – Extrato total (do inglês, total extract)
- UR – Umidade relativa
- UI – Unidade inibitória
- UA – Unidade de atividade

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Pág.

Figura 1. Ovos (A), larva de terceiro estágio (B) e adulto de <i>Haemonchus contortus</i> (C).....	21
Figura 2. Representação esquemática do ciclo de vida do nematoide gastrointestinal <i>Haemonchus contortus</i>	22
Figura 3. Imagem da espécie <i>Leucaena leucocephala</i>	26
Figura 4. Imagem da espécie <i>Spigelia anthelmia</i>	27

CAPÍTULO 1

Figura 1. A) Concentração de proteína (mgP gMF ⁻¹) de extratos de sementes de <i>Leucaena leucocephala</i> B) Atividade proteolítica dos extratos proteicos em UA (Unidade de Atividade). C) Análise da atividade inibitória de protease dos extratos proteicos expresso em UI (Unidade de Inibição). D) Atividade quitinásica dos extratos proteicos expressados como nKat (nanokatal).....	49
--	----

CAPÍTULO 2

Figura 1S. Lista de proteínas identificadas em frações de <i>Spigelia anthelmia</i> por LC-ESI-MS. LPF: fração proteica de folha; SPF: fração proteica de caule e RPF: fração proteica de raiz.....	71
Figura 2S. Cromatograma representativo por HPLC-UV (254 nm) das frações proteicas de <i>Spigelia anthelmia</i> (A): LPF: fração proteica de folha; (B) SPF: fração proteica de caule e (C) RPF: fração proteica de raiz.....	80
Figura 3S. Efeito da fração proteica de folhas (A), fração proteica de caule (B) e fração proteica de raiz (C) de <i>Spigelia anthelmia</i> , sobre a inibição do desembainhamento <i>in vitro</i> de larvas de terceiro estágio de <i>Haemonchus contortus</i>	81

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1. Plantas utilizadas nos últimos anos com ação sobre diversos parasitos gastrointestinais.....	24
--	----

CAPÍTULO I

Tabela 1. Eficácia dos diferentes extratos proteicos de <i>Leucaena leucocephala</i> sobre ovos de <i>Haemonchus contortus</i>	49
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Atividade proteolítica (UA), atividade inibitória de protease (UI), atividade de quitinase (nKat) e atividade de lectina (UH) de frações proteicas obtidas de <i>Spigelia anthelmia</i>	68
Tabela 2. Identificação das proteínas relacionadas com a defesa nas frações de <i>Spigelia anthelmia</i> por ESI-LC-MS/MS.....	69
Tabela 3. Concentração efetiva (EC ₅₀) em mg mL ⁻¹ obtidas a partir das frações proteicas de <i>Spigelia anthelmia</i> sobre ovos e larvas de <i>Haemonchus contortus</i>	70

RESUMO

Haemonchus contortus (RUDOLPHI, 1803) é uma espécie de nematoide gastrointestinal de grande importância devido aos prejuízos que causa na pecuária. Produtos naturais vêm sendo estudados como alternativa ao uso de anti-helmínticos comerciais, responsáveis pelo desenvolvimento de resistência nos parasitos. Este estudo tem como principal objetivo verificar a atividade anti-helmíntica de extratos proteicos de *Leucaena leucocephala* (Linn.) e *Spigelia anthelmia* (Linn.) contra o nematoide *H. contortus*. O presente trabalho foi dividido em dois capítulos. No capítulo 1, sementes de *L. leucocephala* foram trituradas e a farinha resultante, homogeneizada em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7. A suspensão obtida foi centrifugada (15.000 x *g* a 4 °C por 30 min). Após centrifugação, o sobrenadante obtido foi denominado: Extrato total (TE), extrato de cotilédone (CE) e extrato de casca (SE). O teor de proteínas, atividade proteolítica, inibitória de protease, quitinolítica e ação anti-helmíntica dos extratos de *L. leucocephala* sobre *H. contortus* foram verificados. Para cada tratamento foi calculada a concentração efetiva (EC) das amostras sobre o nematoide. Os extratos TE e CE apresentaram elevado teor proteico, além de possuírem atividade proteolítica, quitinolítica e inibitória de protease e inibirem a eclosão dos ovos (EC₅₀ 0,33 e 0,48 mg mL⁻¹, respectivamente). No entanto, amostras de *L. leucocephala* não inibiram o desembainhamento larvar de *H. contortus*. Conclui-se que proteínas estão correlacionadas com a ação de *L. leucocephala* sobre *H. contortus*. No capítulo 2, as partes de *S. anthelmia* foram separadas em folhas, raízes e caule e, lavadas com água destilada, liofilizadas e subsequentemente trituradas. Posteriormente as proteínas foram solubilizadas em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7. A suspensão foi centrifugada (15.000 x *g* a 4 °C por 30 min) e o sobrenadante recolhido para análises. A partir da precipitação com sulfato de amônio (0-90%) dos extratos de *S. anthelmia* e diálise em membrana com exclusão molecular de 14 kDa, frações proteicas foram obtidas e denominadas: Fração proteica de folha (LPF), fração proteica de caule (SPF), fração proteica de raiz (RPF). As amostras foram submetidas a análise por cromatografia líquida de alta eficiência para detecção de compostos do metabolismo secundário e, espectrometria de massas para identificação de possíveis proteínas bioativas presentes. O teor de proteínas, atividade proteolítica, inibitória de protease, quitinolítica, hemaglutinante e ação anti-helmíntica das frações proteicas de *S. anthelmia* sobre *H. contortus* foram verificados. Para cada tratamento foi calculada a concentração efetiva (EC) das amostras sobre o nematoide. As frações de *S. anthelmia* apresentaram efeito inibitório sobre a eclosão dos ovos, sendo este efeito mais pronunciado pela LPF (EC₅₀ 0,17 mg mL⁻¹). Além disso, foi verificada maior inibição do desembainhamento larvar por LPF e RPF (EC₅₀ 0,27 e 0,25 mg mL⁻¹, respectivamente). As frações proteicas de raiz, caule e folha de *S. anthelmia* foram efetivas sobre a inibição da

migração larvar (EC_{50} 0,11; 0,14 e 0,21 mg mL⁻¹, respectivamente). Não foram detectados compostos do metabolismo secundário nas frações de *S. anthelmia*, enquanto diversas proteínas com potencial anti-helmíntico foram identificadas por espectrometria de massas. Conclui-se que proteínas estão correlacionadas com a ação de *S. anthelmia* sobre *H. contortus*, tendo potenciais para o desenvolvimento de produtos anti-helmínticos. Assim, as proteínas bioativas presentes em *L. leucocephala* e *S. anthelmia* possuem propriedades farmacológicas promissoras para o controle do nematoide *H. contortus*.

Palavras chaves: Nematoide, controle alternativo, proteínas vegetais, pecuária.

ABSTRACT

Haemonchus contortus (RUDOLPHI, 1803) is a species of gastrointestinal nematode of great importance due to the damages caused in livestock. Natural products have been studied as an alternative to the use of commercial anthelmintics, responsible for the development of resistance in parasites. This study has as main objective to verify the anthelmintic activity of protein extracts of *Leucaena leucocephala* (Linn.) and *Spigelia anthelmia* (Linn.) against the nematode *H. contortus*. The present work was divided in two chapters. In chapter 1, *L. leucocephala* seeds were ground and the resulting flour, homogenized in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7. The suspension obtained was centrifuged (15,000 x g at 4 ° C for 30 min). After centrifugation, the obtained supernatant was denominated: Total extract (TE), cotyledon extract (CE) and shell extract (SE). The protein content, proteolytic, protease inhibitory, chitinolytic and anthelmintic activity of *L. leucocephala* extracts on *H. contortus* were verified. For each treatment, the effective concentration (EC) of the samples on the nematode was calculated. The extracts TE and CE presented a high protein content, besides having proteolytic, chitinolytic and protease inhibitory activity and inhibiting egg hatching (EC₅₀ 0.33 and 0.48 mg mL⁻¹, respectively). However, *L. leucocephala* samples did not inhibit the larvae of *H. contortus*. It is concluded that proteins are correlated with the action of *L. leucocephala* on *H. contortus*. In Chapter 2, the parts of *S. anthelmia* were separated into leaves, roots and stem and, washed with distilled water, lyophilized and subsequently crushed. Subsequently the proteins were solubilized in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7. The suspension was centrifuged (15,000 x g at 4 ° C for 30 min) and the supernatant collected for analysis. From the ammonium sulfate precipitation (0-90%) of *S. anthelmia* extracts and membrane dialysis with 14 kDa molecular exclusion, protein fractions were obtained and denominated: Leaf protein fraction (LPF), stem protein fraction (SPF), root protein fraction (RPF). The samples were submitted to analysis by high performance liquid chromatography for the detection of compounds of secondary metabolism and mass spectrometry to identify possible bioactive proteins present. The protein content, proteolytic, protease inhibitory, chitinolytic, haemagglutinating and anthelmintic action of *S. anthelmia* protein fractions on *H. contortus* were verified. For each treatment, the effective concentration (EC) of the samples on the nematode was calculated. Fractions of *S. anthelmia* had an inhibitory effect on egg hatching, and this effect was more pronounced by LPF (EC₅₀ 0.17 mg mL⁻¹). In addition, greater inhibition of larvae by LPF and RPF (EC₅₀ 0.27 and 0.25 mg mL⁻¹, respectively) was observed. The protein fractions of root, stem and leaf of *S. anthelmia* were effective on the inhibition of larval migration (EC₅₀ 0.11, 0.14 and 0.21 mg mL⁻¹, respectively). No secondary metabolite compounds were detected in the *S. anthelmia* fractions, while several proteins with anthelmintic potential were identified by mass spectrometry. It is concluded that proteins are correlated with the

action of *S. anthelmia* on *H. contortus*, having potential for the development of anthelmintic products. Thus, the bioactive proteins present in *L. leucocephala* and *S. anthelmia* have promising pharmacological properties for the control of the *H. contortus* nematode.

Key words: Nematode, alternative control, plants proteins, livestock.

1. INTRODUÇÃO

A criação de pequenos ruminantes, assim como outras atividades da pecuária, está em constante desenvolvimento. O Brasil se destaca pela produção de caprinos e ovinos, chegando a 18ª posição mundialmente (MAPA, 2016). Na região Nordeste, a caprinocultura e ovinocultura representam, respectivamente, 91,61% e 57,49% da exploração agropecuária (IBGE, 2014).

No Maranhão, a criação de caprinos e ovinos mostra-se como atividade de grande importância para a agricultura familiar e uma excelente alternativa para a agricultura comercial (SILVA, 2011). No entanto, as doenças parasitárias ocupam lugar de destaque entre os fatores que limitam a produção de pequenos ruminantes (PEREIRA, 2011).

O parasitismo por nematoides gastrintestinais é o principal causador da maioria das doenças em ovinos e caprinos (RODRIGUEZ et al., 2015). Entre os principais nematóides gastrintestinais responsáveis pelas verminoses se destacam os gêneros: *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Strongyloides*, *Cooperia*, *Bunostomum*, *Trichuris*, *Skrjabinema*, *Oesophagostomum* (ANDRIOLA et al., 2011). No entanto, o gênero *Haemonchus* apresenta maior importância médico-veterinária por ser responsável por taxas crescentes de mortalidade dos animais (CLIMENI et al., 2008).

Atualmente, o controle parasitário tem sido largamente realizado pelo uso de produtos químicos sintéticos, denominados anti-helmínticos. A utilização desses produtos proporcionou aumento na produtividade dos rebanhos (AMARANTE, 2009). Porém o uso excessivo e inadequado colaborou para a seleção de cepas resistentes, resultando na ineficiência da maioria dos produtos atualmente disponíveis (ALVES et al., 2012; ROEBER et al., 2013; HOSTE et al., 2015).

O aumento da resistência a anti-helmínticos tem ocasionado grandes impactos econômicos para a pecuária mundial. Nos Estados Unidos, anualmente, os prejuízos ocasionados pelas verminoses chegam a 300 milhões de dólares. Ainda não existem estimativas atuais de perdas econômicas no Brasil, porém, no ano 2000, os gastos com produtos antiparasitários chegaram a 223 milhões de dólares (COSTA-JUNIOR & AMARANTE, 2015).

Alternativamente, o uso de produtos naturais tem se tornado grande potencial no controle de parasitos (OLIVEIRA et al., 2011). A utilização de plantas reduz o uso de anti-helmínticos comercialmente disponíveis, prolongando a vida útil desses produtos (FERREIRA et al., 2013; MACEDO et al., 2015; KUMARASINGHA et al., 2016). Produtos fitoterápicos com atividade anti-helmíntica surgem como uma possibilidade de tratamento simples, além disso, reduz custos, são biodegradáveis, não causam poluição ambiental e apresentam como vantagem, o desenvolvimento mais lento da resistência (NOGUEIRA et al., 2006; CHAGAS et al., 2011; MACEDO, 2012).

Dentre os metabólitos produzidos pelas plantas, as proteínas possuem grande importância, sendo responsáveis pela maioria dos processos biológicos. As proteínas relacionadas à defesa vegetal têm demonstrado diversas propriedades biológicas, dentre elas, nematicidas, tornando-se potenciais no desenvolvimento de novos produtos para o controle de *H. contortus* (RÍOS-DE-ÁLVAREZ et al., 2012; BRAGA et al., 2014; HEIM et al., 2015).

Apesar das numerosas pesquisas que demonstram a importância dos produtos naturais para o controle de nematoides gastrintestinais de caprinos e ovinos, estudos minuciosos que visem identificar e entender o mecanismo de ação de moléculas biologicamente ativas, principalmente proteínas, são necessários. Neste contexto, a fim de compreendermos os efeitos de proteínas vegetais sobre parasitos gastrintestinais, este estudo foi desenvolvido baseado na seguinte questão: extratos proteicos de *Leucaena leucocephala* (Linn.) e *Spigelia anthelmia* (Linn.) possuem ação sobre o nematoide *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803)?

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Haemonchus contortus* (RUDOLPHI, 1803)

Haemonchus contortus é um parasito pertencente ao filo Nematelminto; Classe Nematoda; Superfamília Trichostrongyloidea; Gênero *Haemonchus*, que acomete pequenos ruminantes, principalmente os caprinos (GEORGE, 1998). Durante seu desenvolvimento passa por diversas fases, apresentando-se como ovos, larvas e adultos (Figura 1).



Figura 1. Ovos larvados (setas vermelhas) (A), larva de terceiro estágio (B) e adulto de *Haemonchus contortus* (C). Fonte: Próprio autor.

A cutícula do ovo do *H. contortus* é formada por três camadas: uma vitelínica; uma quitinosa e uma formada por lipídios e algumas proteínas (MANSFIELD et al., 1992). O principal constituinte estrutural do ovo é o colesterol, responsável pela fluidez e a permeabilidade da membrana. As proteínas presentes podem desempenhar diversas funções como: respiração celular, comunicação entre células, crescimento, transporte e reconhecimento celular (CARVALHO, 2011). Em Nematoda, a eclosão é iniciada por estímulos ambientais e pelas enzimas da eclosão, liberadas pelo próprio embrião (ROGERS; BROOKS, 1977). Estas enzimas presentes no fluido de eclosão de *H. contortus* estão incluídas nos grupos das proteases, lipases, quitinases, α e β - glicosidases e leucinas aminopeptidases (ROGERS & BROOKS, 1977). A inibição destas enzimas causa redução ou inibição total do processo de eclosão (ROGERS & SOMMERVILLE, 1962).

As larvas de nematoides possuem uma cutícula morfocomplexa, formada principalmente de lipídios, carboidratos e proteínas como colágeno (FETTERER &

RHOADS, 1993). As funções do colágeno são: crescimento e diferenciação celular, manutenção da arquitetura tecidual e regulação do fluxo de macromoléculas dentro dos tecidos (SHAMANSKY et al., 1989; RHOADS & FETTERER, 1990; COX, 1992).

As larvas de primeiro estágio (L_1) apresentam forma de vírgula com células intestinais cheias de grânulos. Possuem um esôfago reto de forma rabadóide formada por três porções: corpo, istmo e bulbo. Morfologicamente, as larvas de segundo estágio (L_2) e de terceiro estágio (L_3) são similares, no entanto, diferem especificamente pela presença de uma segunda cutícula protetora chamada bainha presente em L_3 (VEGLIA, 1915). O processo de perda da bainha ou desembainhamento ocorre após a ingestão das larvas pelo animal, onde a mudança de pH, temperatura e exposição a dióxido de carbono dentro do animal, estimula a secreção de fluido rico em enzimas promovendo a digestão da bainha e a liberação das larvas no abomaso (ROGERS, 1962; 1965; 1966).

Os adultos deste nematoide possuem tamanhos que variam entre 1 a 3 cm de comprimento e podem ser facilmente identificados devido a sua localização específica no abomaso (AMARANTE, 2005). Possuem uma cavidade bucal armada com uma lanceta que permite perfurar e fixar-se no intestino do animal, além disso, os machos apresentam um raio dorsal assimétrico em sua bolsa copuladora e espículos curtos e cuneiformes. As fêmeas possuem útero longo e branco, repleto de ovos que se espirala em torno do intestino cheio de sangue (ALMEIDA, 1935; LICHTENFELS et al., 1994). A vulva localiza-se próximo à extremidade da cauda, as estruturas morfológicas das abas vulvares variam entre as espécies e subespécies (GEORGE, 1998; BOWMAN, 2006).

O estudo das características estruturais do ovo e da cutícula dos nematoides é uma importante ferramenta para o entendimento da penetração de substâncias antiparasitárias, bem como seu modo de ação e mecanismos de desenvolvimento da resistência.

2.2 Ciclo de vida do *H. contortus* e hemoncose

H. contortus é um parasito monóxeno, não necessitando de um hospedeiro intermediário para completar seu ciclo biológico. Possuem duas fases durante seu ciclo: Fase de vida parasitária e fase de vida livre (TAYLOR et al., 2009).

Durante o ciclo de vida, o nematoide *H. contortus* passa por cinco estádios larvais. Resumidamente, durante a fase de vida livre, os ovos presentes no meio ambiente, eclodem num período de 2-3h e dão origem às larvas de primeiro estágio (L₁). Estas se alimentam de bactérias presentes no ambiente e em 24-27h se desenvolvem em larvas de segundo estágio (L₂) e em poucos dias se transformam em larvas de terceiro estágio (L₃) ou larvas infectantes (FORTES, 2004). As larvas infectantes ao serem ingeridas no pasto pelos animais se fixam na mucosa abomasal, mudam para larva de quarto e quinto estádios (L₄ e L₅) sucessivamente, e em alguns dias se tornam adultos. Durante a fase parasitária, os adultos presentes no abomaso dos animais se reproduzem e as fêmeas eliminam seus ovos junto com as fezes na pastagem, iniciando novamente o ciclo como esquematizado na figura 2.

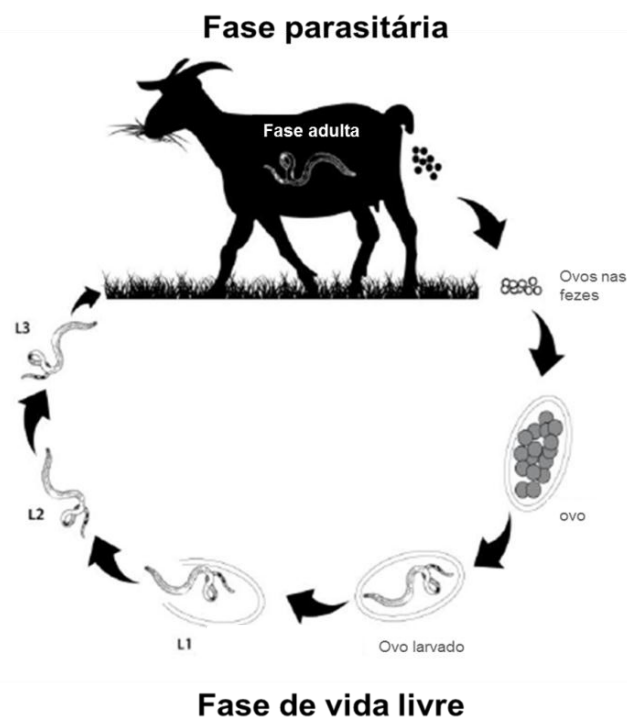


Figura 2: Representação esquemática do ciclo de vida do nematoide gastrointestinal *Haemonchus contortus*. Fonte: Martinez-Ortiz-de-Montellano et al., 2010.

As altas taxas de infecção pelo parasito pode ocasionar a hemoncose, doença responsável por sérios danos à saúde do animal. Dentre os principais sintomas provocados se destacam: anemia severa, palidez das membranas mucosas, dificuldade respiratória, perda de peso, fraqueza, aparecimento de edema mandibular, redução na eficiência reprodutiva e na maioria dos casos, resulta na morte do animal (KEMP et al., 2009; CARVALHO, 2011; YUKI, 2012).

A patogenia e os sinais clínicos variam de acordo com a idade do hospedeiro, estado nutricional, intensidade do parasitismo e espécies de nematoides envolvidos (MARIE-MAGDELEINE et al., 2010; SADDIQI et al., 2011).

2.3 Controle de nematoides gastrintestinais e resistência anti-helmíntica

O controle de nematoides gastrintestinais vem sendo feito com o uso de anti-helmínticos pertencentes a diversos grupos químicos. Os principais grupos de produtos anti-helmínticos são classificados conforme seu mecanismo de ação: Grupo I- Benzimidazóis e Pró-benzimidazóis; Grupo II- Imidazóis e Pirimidinas, Grupo III- Salicilanilidas e Substitutos nitrofenólicos; Grupo IV- Organofosforados; Grupo V – Lactonas macrocíclicas (MATTOS & CASTRO, 2002). Em 1981, surgiu um novo grupo químico de anti-helmíntico muito utilizado atualmente, as Ivermectinas (MELO et al., 2003).

A resistência dos nematoides às substâncias químicas comercialmente disponíveis é um problema que vem sendo relatado no Brasil e no mundo (DOMKE et al., 2012; MARTÍNEZ-VALLADARES et al., 2013; GEURDEN et al., 2014). Um dos primeiros relatos da existência de resistência ao anti-helmíntico foi na década de 70, nos Estados Unidos, em um rebanho de ovinos mantido em uma fazenda experimental (THEODORIDES et al., 1970), posteriormente o relato de resistência ocorreu na África do Sul (BERGER, 1975), Nova Zelândia (KETTLE et al., 1983) e na França (KERBOUEF & HUBERT, 1985). No Brasil, o primeiro relato de resistência a anti-helmínticos ocorreu no Rio Grande do Sul (DOS SANTOS & GONÇALVES, 1967). Na região Nordeste brasileira a primeira suspeita de nematoides gastrintestinais de caprinos resistentes aos anti-helmínticos foi relatada

por Vieira (1986) no Ceará, em seguida no estado de Pernambuco (CHARLES et al.,1989), Bahia (BARRETO & SILVA,1999) e em Alagoas (BISPO et al., 2002), evidenciando o problema.

A resistência a um produto químico se instala quando a droga potencialmente ativa torna-se incapaz de eliminar a população parasitária quando exposta as dosagens terapêuticas recomendadas (JABBAR, et al., 2006). A existência da resistência é influenciada pelo tamanho e diversidade da população, taxa de mutação dos genes envolvidos, além disso, o aparecimento de cepas de nematoides resistentes também pode ser explicado pela teoria da evolução, através da seleção natural (THOMAZ-SOCCOL et al., 2004, MELO, 2005; SISSAY et al., 2006).

2.4 Plantas no controle de nematoides gastrintestinais

As plantas vêm sendo utilizados durante séculos por povos indígenas que usavam extratos vegetais no tratamento de várias patologias humanas e animais (BEHNKE et al., 2008). O aumento da prevalência de nematoides resistentes aos anti-helmínticos tradicionais tem sido a principal causa para o desenvolvimento de medidas alternativas para o controle parasitário (MOLENTO et al., 2013). Neste contexto, o uso de produtos naturais vem sendo utilizado como alternativa no controle das parasitoses em caprinos e ovinos.

Os extratos vegetais têm demonstrado excelentes resultados no tratamento dos parasitos gastrintestinais oferecendo oportunidades seguras e eficazes (BAURI et al., 2015; KUMARASINGHA et al., 2016). A tabela 1 traz um resumo de plantas com atividade anti-helmíntica sobre parasitos gastrintestinais utilizadas nos últimos anos.

Tabela 1. Plantas utilizadas nos últimos anos com ação sobre parasitos gastrointestinais

Nome científico	Nome vernacular	Espécie de nematoide	Referência
<i>Melia azedarach</i>	Cinamomo	<i>H. contortus</i>	Kamaraj et al., 2010
<i>Carapa guianensis</i>	Andiroba	<i>Haemonchus sp,</i> <i>Oesophagostomum sp e</i> <i>Trichostrongylus sp.</i>	Farias et al., 2010

<i>Lysiloma latisiliquum</i>	Tamarindo-falso	<i>H. contortus</i>	Martínez-Ortiz-De-Montellano et al., 2010
<i>Acacia nilotica</i>	Espinho-Preto	<i>H. contortus</i>	Badar et al., 2011
<i>Jatropha curcas</i>	Pinhão manso	<i>H. contortus</i>	Monteiro et al., 2011
<i>Leucaena leucocephala</i>	Leucena	<i>H. contortus</i>	Alonzo-Díaz et al., 2011
<i>Carica papaya</i>	Mamão	<i>Capillaria spp; A. galli; A. caninum</i>	Buttle et al., 2011; Shaziya et al., 2012
<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	Capim-limão	<i>H. contortus</i>	Katiki et al., 2012
<i>Nigella sativa</i>	Comino-preto	<i>H. contortus; M.expansa; F. gigantea</i>	Shalaby et al., 2012
<i>Euphorbia helioscopia</i>	Erva-de-santa-luzia	<i>H. contortus</i>	Lone et al., 2012
<i>Juniperus pinchotii</i>	Cedro-vermelho	<i>H. contortus</i>	Whitney et al., 2013
<i>Ananas comosus</i>	Abacaxi	<i>H. contortus</i>	Domingues et al., 2013
<i>Annona muricata</i>	Graviola	<i>H. contortus</i>	Ferreira et al., 2013
<i>Thymus capitatus</i>	Alecrim-da-serra	<i>H. contortus</i>	Elandaloussi et al., 2013
<i>Allisum sativum</i>	Alho	<i>H. contortus; C. cotylophorum</i>	Radwan et al., 2012; Shalaby & Farag, 2014
<i>Zingiber officinale</i>	Gengibre	<i>H. nana</i>	Lin et al, 2014
<i>Ocimum sanctum</i>	Manjeriço-sagrado	<i>C. cotylophorum</i>	Karumari et al., 2014
<i>Azadirachta indica</i>	Nim	<i>H. contortus; Trichostrongilus sp; P. falciparum; A. galli; Eudrilus eugeniae</i>	Iqbal et al., 2010; Rabiú & Subhasish, 2011; Hogade et al., 2014
<i>Artemisia vestita</i>	Artemísia-comum	<i>H. contortus</i>	Irum et al., 2015
<i>Acacia pennatula</i>	Acácia	<i>H. contortus</i>	Chan-Perez et al., 2016
<i>Onobrychis viciifolia</i>	Sanfeno, esparzeta	<i>H. contortus; T. colubriformis; C. curticei</i>	Arroyo-Lopez et al., 2014; Gaudin et al., 2016; Chan-Perez et al., 2016
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho, Arçã	<i>H. contortus</i>	Ferreira et al., 2016
<i>Coffea arabica</i>	Café-arábica	<i>H. contortus</i>	Ortiz-Ocampo et al., 2016

2.4.1 *Leucaena leucocephala* (Linn.)

O gênero *Leucaena* pertencente à família Fabaceae é composto por 24 espécies (MABBERLEY,1997). Espécies desse gênero caracterizam-se por medir entre 5 a 10 metros de altura, apresentar folhas alternas bipinadas, as flores possuem corola e estames brancos, vagens agrupadas e achatadas de coloração marrom-escura, com um bico no ápice com sementes de coloração marrom (Figura 3).

Leucaena leucocephala L., de nome popular leucena é uma leguminosa nativa do Sul do México e Norte da América Central, mas pode ser encontrada em várias partes do mundo (NEHDI et al., 2014). É bem conhecida por seu valor nutricional e medicinal. No Brasil, é utilizada como forragem para pequenos animais devido sua riqueza em proteínas e nutrientes (SAFWAT et al., 2014, PHESATCHA & WANAPAT, 2016).



Figura 3. Imagem da espécie *Leucaena leucocephala* (Fonte: Próprio autor)

Além disso, preparações feitas a partir das partes vegetais de *L. leucocephala* têm sido utilizadas pela medicina tradicional no controle de muitas doenças. Há relatos de sua atividade contra diabetes (SYAMSUDIN & PARTOMUAN, 2010), linhagens tumorais (GAMAL-ELDEEN et al., 2007) e contra o parasito *H. contortus* (OLIVEIRA et al., 2011; VON SON-DE-FERNEX et al. 2014). Inibidor de protease purificado de sementes de leucena apresentou potencial inseticida sobre *Aedes*

aegypti. onde a proteína atuou sobre a inibição da eclosão de ovos, interrompendo ou retardando o desenvolvimento larvar, e até mesmo provocando a morte (FILHO et al., 2016). É importante salientar que ainda são limitados os estudos que avaliam as propriedades biológicas de proteínas bioativas de *L. leucocephala*.

2.4.2 *Spigelia anthelmia* (Linn.)

Spigelia é um dos 13 gêneros pertencente à família Logoniaceae descrito por Linnaeus em 1753. Este gênero caracteriza-se por plantas herbáceas, de folhas opostas, verticiladas ou inconspícuas, presença de inflorescências terminais de cor rósea, em cimeiras escorpióides ou fascículos, flores gamopétalas, corola creme com estrias violáceas, prefloração valvar, estigma papiloso, com caule, cálice e fruto imaturo esverdeado (FERNÁNDEZ-CASAS, 2014) (Figura 4).

Spigelia anthelmia L. é uma espécie nativa da América do Sul que é cultivada em várias regiões do mundo devido suas propriedades medicinais (BASILIO et al., 2003). No Brasil sua distribuição ocorre entre as regiões Norte e Sudeste do país (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2004). A planta é conhecida popularmente como erva-lombrigueira ou arapabaca. Em alguns países da África e Ásia esta planta é muito utilizada devida sua ação sobre *H. contortus* (MORAIS et al., 2002; ASSIS et al., 2003, ADEMOLA et al., 2007).



Figura 4. Imagem da espécie *Spigelia anthelmia* (Fonte: Próprio autor)

O uso homeopático desta planta contra distúrbios cardíacos e neurálgicos foi observado (ACHENBACH et al., 1995). Extratos foliares de *S. anthelmia* obtidos com solvente orgânico apresentaram atividade neuromuscular, atuando como bloqueador provocando um efeito relaxante em músculos de ratos experimentais (CAMURÇA-VASCONCELOS et al. 2004). Extratos aquosos e etanólicos de *S. anthelmia* apresentaram efeito anti-helmíntico *in vitro* e *in vivo* sobre os nematoides gastrintestinais de ovelhas, *Strongyloides* spp., *Oesophagostomum* spp., *Trichuris* spp., *Haemonchus* spp., e *Trichostrongylus* spp (ADEMOLA et al., 2007).

Apesar da atividade anti-helmíntica descrita, os estudos indicam que o possível mecanismo de ação dos extratos é induzido pela presença de compostos fitoquímicos do metabolismo secundário, como por exemplo, os alcalóides, flavonóides e saponinas (MORAIS et al., 2002; CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2004; ADEMOLA et al., 2007), não existindo, até o momento, estudos descrevendo a relação de proteínas desta planta com a referida atividade biológica.

2.5 Proteínas vegetais potenciais para o controle de *H. contortus*

Levando-se em consideração a ação de proteínas vegetais sobre diferentes organismos, incluindo nematoides, fungos, bactérias e dentre outros (STEPEK et al., 2007; COSTA et al., 2010; ARULPANDI & SANGEETHA, 2012), estas macromoléculas surgem como potencial para o controle de *H. contortus*. Algumas proteínas vegetais se destacam com relação ao seu potencial biotecnológico, dentre eles, nematicida, como as proteases, inibidores de proteases, lectinas e quitinases (IZUHARA et al., 2008; RIOS-DE-ÁLVAREZ et al., 2012; BRAGA et al., 2014).

2.5.1 Proteases

As enzimas proteolíticas ou proteases catalisam a quebra de ligações peptídicas de outras proteínas e possuem uma grande variedade de funções fisiológicas (SOISSON et al, 2010; RAKASHANDA et al., 2012). As proteases são classificadas em quatro tipos segundo o grupo de resíduos de aminoácidos

funcionais e sitio catalítico. São elas: protease serínica, protease cisteínica, metalo-protease e protease aspártica.

Essas enzimas possuem ampla distribuição. Podem ser encontrados em todos os seres vivos, animais, vegetais e microrganismos (TREMACOLDI et al., 2007). Atualmente, as proteases vegetais têm despertado interesse devido as suas propriedades biológicas. Dentre as enzimas proteolíticas mais estudadas estão: papaína, extraída do látex de frutos de *Carica papaya* (mamão) e a bromelina oriunda do *Ananas comosus* (abacaxi) (LÓPEZ-GARCÍA et al., 2012; MALEK et al., 2016).

A atividade anti-helmíntica de proteases já vem sendo estudado e o principal mecanismo de ação dessas enzimas está relacionado com a hidrólise de proteínas presentes na cutícula do parasito provocando a morte (STEPEK et al., 2007; LIANG et al., 2010, JUNWEI et al., 2013).

2.5.2 Inibidores de protease

Inibidores de protease (IPs) são proteínas capazes de bloquear a atividade de enzimas proteolíticas (SILVA; SILVA, 2000). São classificados em famílias conforme sua especificidade por proteases, ou seja, podem ser do tipo cisteínica, serínica, metalo ou aspártica (LAWRENCE & KOUNDAL, 2002).

Ocorrem em um grande número de organismos vivos, incluindo plantas, animais e microrganismos. Sua ocorrência natural é importante na regulação e desenvolvimento de processos biológicos essenciais. Nas plantas, podem ser encontradas em folhas, caule e sementes, atuando estrategicamente na defesa vegetal, sendo induzidos durante processo de injúria, estresse ou durante ataque de insetos fitofágos e alguns microrganismos patogênicos (DE LEO et al., 2002; LAWRENCE & KOUNDAL, 2002; HABIB & FAZILI, 2007).

Estudos têm apontado que IPs possuem potencial biotecnológico com aplicações na medicina e agricultura. Na literatura, já se encontram trabalhos com relatos de sua atividade contra leishmania, insetos fitofágos, fungos, bactérias, células tumorais e nematoides (KIM et al., 2009; RAHIMI et al, 2012; RAKASHANDA & AMIN, 2013). A atividade nematicida de extratos proteicos de *L. leucocephala*

enriquecido com IPs contra *H. contortus* foi relatada (SOARES et al., 2015). Estas proteínas podem atuar na inibição de enzimas proteolíticas presentes na cutícula dos nematoides retardando o seu desenvolvimento (IZUHARA et al, 2008).

2.5.3 Quitinases

Quitinases pertencem a um grupo de proteínas que clivam as ligações glicosídicas do tipo $\beta(1-4)$ entre polímeros de N-acetil-D-glicosamina, formadores de quitina (HENRISSAT, 1999). A classificação das enzimas quitinolíticas baseia-se em sua similaridade a sequências de aminoácidos, dividindo-se em endo-quitinases e exo-quitinases. Podem ainda ser classificadas em duas grandes famílias glicosil-hidrolases, 18 e 19, sendo a família 19 composta em sua maioria por quitinases de origem vegetal. Além disso, podem também ser divididas em classes (I, II, III, IV, V, VI e VII), que diferem conforme estrutura proteica, especificidade de substrato, mecanismo de catálise e sensibilidade a inibidores (GORTARI & HOURS, 2008; VASCONCELOS, 2011).

A quitina é o segundo maior componente estrutural existente na natureza. Sua presença já foi detectada em uma grande diversidade de organismos, incluindo fungos, moluscos, crustáceos, insetos e ovos de nematoides, desempenhando diferentes funções estruturais (THARANATHAN & KITTER, 2003; VASCONCELOS, 2011). Nas plantas, as quitinases exercem importante papel de defesa contra patógenos e predadores, além de atuar também em processos essenciais como crescimento e desenvolvimento do vegetal (DE JONG et al., 1992).

Atualmente, a exploração ao uso de quitinases de origem vegetal se estende devido aos diversos estudos sobre suas atividades biológicas entre elas, nematicidas. Mercer et al., (1992) observou que quitinase purificada de *Phaseolus vulgaris*, *Serratia marcescens* e *Streptomyces griseus* causam a eclosão prematura de ovos dos fitonematoides de *Meloidogyne hapla*, provocando a mortalidade. Recentemente, Soares et al., (2015) reportou a atividades anti-helmíntica de extratos proteicos de *L. leucocephala* ricos em quitinase sobre ovos do nematoide gastrointestinal *H. contortus*. Quitinases fúngicas também exercem papel fundamental no controle de nematoides. Recentemente, Braga et al., (2014) reportou a atividade

anti-helmíntica de quitinase produzida pelo fungo *D. flagrans* e *P. chlamydosporia* sobre o nematoide de equino, *Strongyloides westeri*.

2.5.4 Lectinas

As lectinas são proteínas não pertencentes ao sistema imune que se ligam a carboidratos e açúcares de forma específica e reversível (HAMID et al., 2013). As lectinas podem ser classificadas de acordo com sua estrutura e especificidade a carboidratos (GALLAGHER, 1984). Portanto, existem as merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas. As merolectinas apresentam apenas um sítio de ligação a carboidratos, sendo considerado monovalente. As hololectinas possuem dois sítios de ligação a carboidratos, idênticos ou homólogos, sendo considerado divalente. As quimerolectinas possuem um ou mais sítios de ligação a carboidratos e um sítio de função distinta e as superlectinas apresentam ao menos um sítio de ligação a carboidrato, sendo que cada sítio reconhece apenas um tipo de carboidrato específico (BATISTA, 2007; JIANG et al., 2010). Além disso, com base na sua especificidade de ligação aos diferentes monossacarídeos podem-se classificar como lectinas ligadas a manose (grupo I), ligadas a galactose (grupo II), ligadas a N-acetil glucosamina (grupo III), ligadas a fucose (grupo IV), ligadas ao ácido siálico (grupo V) e as ligadas a complexos glicanos (grupo X) (GALLAGHER, 1984).

As lectinas podem ser encontradas em uma ampla diversidade de seres vivos, incluindo, microrganismos, fungos, animais e plantas em estruturas como folhas, raízes, caules, flores, porém, estão presentes em maior quantidade em sementes de leguminosas (MENDONZA et al., 2007; LAM; NG, 2011). As sementes são a principal fonte de estudos de lectinas visto que representam, em geral cerca de 10% das proteínas totais presentes dependendo da espécie (LIMA-JÚNIOR et al, 2010). Sua presença nos vegetais está comumente relacionada à defesa contra insetos predadores e alguns fitopatógenos, o que pode ser explicado pela sua capacidade de ligar-se a glicoconjugados presentes em outros organismos e que são totalmente ausentes nas plantas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995) e à sua grande resistência a condições de temperatura, pH entre outros.

Diversos estudos demonstram o potencial do uso de lectinas de plantas na biotecnologia por serem proteínas de grande interesse biológico e médico (MOVAFAGH et al., 2013). Possuem características únicas e sua detecção é feita principalmente por meio de ensaios de hemaglutinação em eritrócitos animal (FROST et al, 1975).

Dentro da ampla aplicabilidade dessas proteínas podemos destacar suas atividades biológicas, entre elas, anti-helmíntica sobre *H. contortus* (BHAT et al., 2010, RÍOS-DE-ALVAREZ et al., 2012, HEIM et al., 2015), produzindo um efeito tóxico no trato digestivo de nematoides ocasionando inibição no desenvolvimento larvar e/ou morte do parasito, além disso, possuem efeito inseticida (COELHO et al., 2007; CHEN et al. 2009) interferindo na alimentação, desenvolvimento, reprodução e sobrevivência de insetos durante seu ciclo de vida e carrapaticida (LIMA et al., 2005), reduzindo o peso de fêmeas ingurgitadas e dos ovos do carrapato bovino após a ovoposição ocasionando esterilidade.

3. Objetivos

3.1 Geral:

Avaliar o potencial anti-helmíntico de extratos e frações proteicas de *Leucaena leucocephala* e *Spigelia anthelmia* sobre o nematoide gastrointestinal *Haemonchus contortus*.

3.2 Específicos:

- Obter extratos e frações proteicas de folhas, caules e raízes de *S. anthelmia* e de sementes de *L. leucocephala*;
- Determinar o teor de proteínas nas amostras proteicas obtidas;
- Verificar a inibição da eclodibilidade dos ovos, desembainhamento e migração larvar do nematoide *H. contortus* quando exposto às amostras proteicas;
- Verificar atividade proteolítica, inibitória de protease, quitinolítica e hemaglutinante das amostras proteicas;
- Detectar presença de metabolitos secundários nas amostras proteicas;
- Identificar as possíveis proteínas presentes nas amostras proteicas.

Atividade anti-helmíntica de extratos proteicos de *Leucaena leucocephala* sobre *Haemonchus contortus*

Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal, v. 24, n. 4, p. 396-401, out.-dez. 2015

Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612015072>

Atividade anti-helmíntica de extratos proteicos de *Leucaena leucocephala* sobre *Haemonchus contortus*

Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* protein extracts on *Haemonchus contortus*

Alexandra Martins dos Santos Soares¹, Sandra Alves de Araújo¹, Suzana Gomes Lopes², Livio Martins Costa Junior^{2*}

¹ Engenharia Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil

² Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil

*Autor para correspondência

Tel.: +55 98 32729547

Endereço de E-mail: livio.martins@ufma.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade anti-helmíntica de extratos proteicos de *Leucaena leucocephala* sobre *Haemonchus contortus*. As sementes, cascas e cotilédones foram moídos separadamente e as proteínas extraídas com tampão fosfato de sódio e denominados: TE (extrato total), SE (extrato casca) e CE (extrato cotilédone). O teor de proteínas, atividade proteolítica, inibitória de protease e quitinolítica dos extratos foram verificados, além da ação sobre a eclosão de ovos e desembainhamento larvar de *H. contortus*. A concentração efetiva (EC_{50}) para inibição de 50% da eclosão dos ovos foi calculada através do probit. Foi demonstrado que TE e CE possuem, em diferentes proporções, proteínas solúveis, protease e quitinase. Atividade inibitória de protease foi encontrada em todos os extratos. A EC_{50} dos extratos CE e TE foram 0,48 e 0,33 mg de proteína mL^{-1} , respectivamente. O extrato SE não apresentou atividade sobre a eclosão dos ovos. Os extratos proteicos testados não apresentaram efeito larvicida sobre *H. contortus*. Concluímos que a ação de extratos proteicos de *L. leucocephala* afeta negativamente a eclodibilidade dos ovos e essa ação possivelmente está associada com a alta atividade de protease e quitinase dos extratos testados.

Palavras-chaves: Proteínas vegetais; protease, inibidor de protease, quitinase.

1. Introdução

Infecções por nematoides gastrintestinais têm sido uma das principais causas de perda de pequenos ruminantes nas criações em todo o mundo (HOUNZANGBE-ADOTE et al 2005; CEZAR et al., 2008). O nematoide *Haemonchus contortus* tem sido considerado o mais importante, devido aos intensos danos causados à pecuária caprina. Atualmente, o controle desses parasitos consiste no uso de anti-helmíntico sintético (OLIVEIRA et al., 2011). No entanto, o uso inadequado destes produtos vem ocasionando à seleção de cepas resistentes (TORRES-ACOSTA & HOSTE, 2008). A utilização de compostos vegetais tem sido considerada uma alternativa para o controle desses parasitos (EGUALE et al., 2007; BUTTLE et al., 2011).

As plantas têm uma variedade de mecanismos químicos de defesa e proteção contra predadores (SHARMA et al., 2011). As sementes possuem proteínas, que dentre outras funções, atuam na defesa contra o ataque de microrganismos patogênicos e fitonematoides, especialmente proteases, inibidores de proteases e quitinases (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002), dentre outros. As proteases são enzimas que catalisam a degradação de proteínas (PESQUET, 2012). Quitinases são enzimas que provocam a degradação da quitina ou alteração na parede celular ou cutícula de fungos e/ou outros parasitos prejudicando o seu desenvolvimento (LONDERSHAUSE et al., 1996). As proteases e quitinases são proteínas que podem ter ação nematicida devido à capacidade de degradação de importantes macromoléculas que constituem a cutícula de nematoides.

Os nematoides apresentam uma cutícula morfologicamente complexa, composta de proteínas resistentes, tais como o colágeno, que funcionam como uma barreira protetora entre o parasito e o ambiente externo (SHAMANSKY et al., 1989; RHOADS & FETTERER, 1990). A cutícula de ovos de *H. contortus* possui três camadas: uma interna composta de lipídios em associação com algumas proteínas; uma intermediária composta de fibras de quitina rodeada por proteínas; e uma camada externa composta de proteínas e lipídios (MANSFIELD et al., 1992).

Os inibidores de protease são proteínas que inibem a atividade de proteases (SILVA & SILVA, 2000). Nematoides gastrintestinais produzem uma variedade de proteases com diferentes funções durante o desenvolvimento (RHOADS et al., 2000; WILLIAMSON, 2003). Assim, os inibidores de protease podem prevenir ou retardar o

desenvolvimento do parasito (IZUHARA et al., 2008), possuindo, assim, potencial biotecnológico para o estudo e desenvolvimento de novos medicamentos anti-helmínticos.

A *Leucaena leucocephala* popularmente conhecida como leucena, é uma das espécies vegetais com potencial anti-helmíntico, sendo uma planta nativa da América Central, mas podendo ser encontrada em regiões tropicais e subtropicais do mundo (LIM, 2012; NEHDI et al., 2014). Leucena é usada como fonte de alimentação para animais domésticos (PRASAD et al., 2011; PANDEY & KUMAR, 2013), e possui propriedades anti-helmínticas descrita contra o nematoide *H. contortus* (OLIVEIRA et al., 2011) e *Trichostrongylus columbriformes* (CUNHA et al., 2003).

Muitos estudos têm demonstrado a ação de extratos vegetais no controle de *H. contortus*, porém são quase inexistentes os trabalhos relatando esta atividade como o uso de extratos proteicos. Assim, este estudo tem como objetivo avaliar se os extratos proteicos de *L. leucocephala* possuem atividade anti-helmíntica sobre o nematoide gastrointestinal, e verificar se as atividades de algumas proteínas poderiam estar relacionadas com a possível bioatividade dos extratos contra este parasito.

2. Métodos

2.1 Material vegetal

As sementes de *L. leucocephala*, foram comercialmente adquiridas (Caiçara Sementes, Brejo Alegre, SP, Brasil) e mecanicamente moídas em um moinho. O material resultante foi denominado, farinha. A extração de lipídios da farinha foi realizada com hexano (1:6, m/v) a 25 °C. Depois de duas trocas de solvente por dia, durante dois dias consecutivos, o hexano foi removido e a farinha foi seca durante 12 h a 25 °C, sob circulação forçada de ar. A farinha obtida foi subsequentemente armazenada em frascos fechados, a -4 °C. Adicionalmente, partes das sementes foram separadas em casca e cotilédones e posteriormente, delipidadas como descrito anteriormente.

2.2 Extração e quantificação das proteínas

As proteínas solúveis das sementes de *L. leucocephala* foram extraídas em tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7.0) (1:5 m/v), em agitação constante durante 3 h, a 4 °C. A suspensão foi centrifugada a 12,000 x *g* por 30 min, a 4 °C. O sobrenadante resultante foi novamente centrifugado nas mesmas condições. Os sobrenadantes finais foram denominados TE: extrato total da semente, SE: extrato da casca e CE: extrato de cotilédone.

As proteínas solúveis de TE, SE e CE foram quantificadas de acordo com Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

O teor de proteína foi expresso como miligramas de proteína por grama de massa fresca e foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$\text{Teor proteico (mgP/gMF}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Concentração de proteína (mg mL}^{-1}\text{)} \times \text{Volume do tampão (mL)}}{\text{Massa da farinha (g)}}$$

2.3 Ensaio de atividade de protease, inibidor de protease e quitinase

A atividade proteolítica de extratos totais de sementes de *L. leucocephala* foi investigada usando Azocaseína como substrato (XAVIER-FILHO et al., 1989). Uma unidade de atividade (UA) foi definida como aumento em 0,01 o valor de absorção medida a 420 nm em espectrofotômetro após 60 min de reação. A atividade específica foi expressa como unidade de atividade proteolítica por miligrama de proteína (UA/mgP).

A atividade inibidora da protease cisteínica foi determinada medindo a inibição da atividade da papaína, usando benzoil-DL-arginina- β -naftilamida (BANA) como substrato (ABE et al., 1992). O resultado foi expresso como unidade de atividade antipapainásica (UI), sendo esta definida como a diminuição de 0,01 na absorbância do controle positivo (100% atividade papaína) por 1 ml de volume da amostra, na ausência do inibidor. A atividade específica foi expressa como unidade de atividade inibitória por miligrama de proteína (UI/mgP).

A determinação da atividade de quitinase consistiu na capacidade da amostra de liberar N-acetil-d-glucosamina (NAG) (REISSIG et al., 1955) por ação hidrolítica a partir de quitina coloidal sendo expressa em nanoKatal (nkat) por miligrama de

proteína (mgP) (BOLLER, 1992). A quitina coloidal foi previamente preparada usando ácido acético anidrido (MOLANO et al., 1977). Um nanokatal foi definido como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 nmol de produto de reação por segundo (s).

2.4 Ensaios biológicos

2.4.1 Obtenção de nematoides

Os ovos e as larvas de terceiro estágio (L₃) de *H. contortus* foram recuperados das fezes de ovinos infectados artificialmente. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Maranhão e foram aprovados por esta comissão sob o número de protocolo 23115018061 / 2011-11.

2.4.2 Ensaio de eclosão de ovos

Ovos de *H. contortus* foram recuperados a partir de fezes de animais infectados artificialmente (BIZIMENYERA et al., 2006). Aproximadamente 100 ovos por poço foram submetidos à incubação com extratos proteicos de sementes de *L. leucocephala* em concentrações de proteína entre 0,05 e 0,8 mg mL⁻¹ em quadruplicata. Os extratos proteicos foram diluídos em tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0). O ensaio continha dois controles: (i) de água destilada; e (ii) tampão (100 mM, pH 7,0) utilizado para preparar e diluir os extratos proteicos. As placas de 24 poços contendo os diferentes extratos e controles foram incubados durante 48 h a 27 °C. Larvas eclodidas (vivas ou mortas) e ovos não eclodidos foram contados sob um microscópio invertido (Primo Vert) com ampliação de 40x.

2.4.3 Ensaio de desembainhamento

Larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* foram obtidas por incubação das fezes recolhidos a partir de animais doadores infectados artificialmente, como descrito por Roberts e O'Sullivan (1950). O ensaio de desembainhamento larval foi realizada de acordo com Bahuaud et al. (2006). Larvas viáveis com idade de 2 a 3 meses foram utilizadas para os ensaios. Os extratos de sementes de *L. leucocephala* foram testados a uma concentração de 0,6 mg mL⁻¹ em tampão fosfato de sódio (100 mM,

50 mM NaCl, pH 7,2). O ensaio foi realizado em quatro repetições, com tampão utilizado como controle negativo. As larvas foram incubadas com extratos proteicos e tampão durante 3 h a 22 °C. Após este período de incubação, as larvas foram lavadas três vezes em tampão por centrifugação durante 5 min. a 102 x g. O desembainhamento artificial foi induzido por adição de solução de hipoclorito de sódio (contendo 2,5% de cloro ativo) (2%, v/v) e cloreto de sódio (16,5%, m/v) diluído em tampão. A cinética da desembainhamento larval nos diferentes tratamentos experimentais foi, então, monitorada por observação em microscópio (40x) (Primo Vert). A percentagem de larvas embainhadas foi identificada em intervalos de 10 minutos, durante 60 minutos.

2.5 Análise estatística

As comparações estatísticas do ensaio de eclosão dos ovos de *H. contortus* foram avaliadas através de ANOVA seguido do teste Bonferroni. A concentração efetiva (EC_{50}) para a inibição de 50% da eclosão dos ovos foi estimada por probit. Taxas do desembainhamento larval foram comparadas pelo teste ANOVA. O nível de significância adotado foi de 0,05%. Todas as análises foram realizadas no GraphPad Prism software, v. 6.0 (GraphPad Software Inc., 2007).

3. Resultados

3.1 Ensaio de teor de proteínas, protease, inibidores de protease e quitinase

O extrato CE apresentou maior teor de proteína (109,95 mgP/gMF⁻¹) em relação ao extrato TE (53,30 mgP/gMF⁻¹). O extrato SE mostrou uma quantidade mínima de proteína (1,67 mgP/gMF⁻¹) (Figura 1).

A atividade de protease não foi detectada em SE. No entanto, a enzima foi detectada em TE (45 UA) sendo maior em CE (95 UA). A atividade inibidora de protease foi encontrada em todos os extratos preparados, mas TE mostrou níveis mais elevados (670 UI). O TE e CE apresentaram atividade quitinase, 0,16 e 0,11 nkat, respectivamente. SE apresentou baixa atividade desta enzima (nkat 0,007) (Figura 1).

3.2 Atividade biológica sobre *H. contortus*

Os diferentes extratos proteicos obtidos a partir de sementes de *L. leucocephala* mostraram distintos efeitos ovicidas em *H. contortus* (Tabela 1). TE mostrou eficácia ovicida contra *H. contortus* (99,2% e 56,6% a 0,8 e 0,4 mg mL⁻¹, respectivamente). CE apresentou eficácia ovicida de 83,4% a 0,8 mg mL⁻¹, um valor significativamente inferior em comparação com o TE ($p < 0,05$). Esta diferença de eficácia foi refletida em valores de EC₅₀. A EC₅₀ de CE (0,48 mg mL⁻¹, IC 95% 0,40-0,57) foi maior do que EC₅₀ de TE (0,33 mg mL⁻¹, IC 95% 0,29-0,38). SE não apresentou efeito ovicida contra *H. contortus* nas concentrações testadas. O TE e CE foram testados contra larvas de *H. contortus* em 0,6 mg mL⁻¹. As taxas de perda cuticulares obtidos no controle (tampão), TE e CE não diferiu após 60 minutos (98,8, 98,2 e 95,3%, respectivamente).

4. Discussão

As plantas têm sido estudadas como uma importante estratégia para controlar os parasitos de animais e seres humanos devido as suas inúmeras propriedades medicinais e terapêuticas (HERNÁNDEZ-VILLEGAS et al., 2011). Tendo em conta a importância do controle do nematoide *H. contortus* para o desenvolvimento de caprinos e ovinos, estudos foram realizados utilizando extratos vegetais para esta finalidade (ALONSO-DÍAZ et al., 2008; MARIE-MAGDELEINE et al., 2010; HERNÁNDEZ-VILLEGAS et al., 2011).

Apesar de metabólitos secundários terem sido amplamente correlacionados com efeitos nematicidas, mostrando sua aplicabilidade no controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes, as proteínas vegetais representam um novo campo de pesquisa para o controle desses parasitos (SALLES et al., 2014). O segmento de proteínas terapêuticas é um dos que mais cresce no mercado farmacêutico e seu estudo passa por várias gerações de desenvolvimento, a fim de conseguir produtos cada vez mais viáveis do ponto de vista comercial. Estas proteínas têm diversas vantagens comerciais como a simplicidade da produção de um custo relativamente baixo; alta biodisponibilidade e reduz o risco de efeitos colaterais (MARTIN, 2006). No presente trabalho, o extrato SE mostrou baixíssima

quantidade de proteínas solúveis, mas TE e CE apresentou 53,30 e 109,95 mgP/gMF⁻¹, respectivamente (Figura 1A).

Pouco se sabe sobre os efeitos anti-helmínticos da protease cisteína, mas alguns estudos mostraram que o mecanismo de ação destas enzimas pode estar associado à degradação da cutícula do nematoide, causando danos sérios e levando-o à morte (PHIRI et al., 2013; LUOGA et al., 2013). Assim como proteases, os inibidores de protease também desempenham papel importante no controle de parasitos, inibindo as proteínas necessárias para o desenvolvimento dos nematoides (LAWRENCE & KOWNDAL, 2002). Os extratos TE e CE apresentaram atividade proteolítica (Figura 1B). Proteases extraídos de *Carica papaya*, *Ananas comosus* e *Ficus sp.* mostraram ação contra os nematoides de plantas, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Globodera rostochiensis* e nematoides de roedores, *Trichuris muris*, *Protospirura muricola* e *Heligmosomoides polygyrus* (STEPEK et al., 2006, 2007a,b,c).

Os extratos proteicos obtidos neste estudo apresentaram atividade inibidora da protease (Figura 1C). Os inibidores de protease são proteínas presentes em todos os seres vivos e possuem função de proteção. Nos nematoides, as metaloproteinases são importantes na formação da cutícula desses parasitos.

Os inibidores da protease, ao inibir proteases presentes na cutícula do parasito, podem impedir o seu desenvolvimento (LAWRENCE & KOUNDAL, 2002). A casca de ovos de *H. contortus* possui uma camada formada de proteínas, incluindo algumas proteases (MANSFIELD et al., 1992). As proteases estão presentes em todos os estádios de desenvolvimento do parasito, e a utilização de inibidores de proteases pode ser uma alternativa para controlar esses nematoides. No entanto, no presente estudo, não se encontrou correlação entre a concentração de inibidores de proteases e inibição da eclosão dos ovos.

A atividade de quitinase foi verificada principalmente em TE e CE (Figura 1D). Nos ovos, a quitina é um componente importante, e atua como uma barreira protetora contra o ambiente externo (ROGERS & BROOKS, 1977). As principais proteínas dos ovos da cutícula de *H. contortus* são degradadas pela proteinase K e quitinase (MANSFIELD et al., 1992). Fungos patogênicos e alguns nematoides usam quitinase para quebrar essa barreira de proteção e penetram no hospedeiro (HUBER

et al., 1991; LEGER et al., 1993; SAHABUDDIN et al., 1993). Nós mostramos aqui, que os extratos TE e CE impediram que os ovos de *H. contortus* eclodissem. A eficiência dos extratos TE e CE coincide com alta atividade de protease e quitinase, sugerindo que estas enzimas podem ter potenciais propriedades ovicidas.

Extratos acetônicos e aquosos, obtidos a partir das partes aéreas de *L. leucocephala*, mostraram 90% de eficácia larvicida contra *H. contortus* (OLIVEIRA et al., 2011). No entanto, este método extrai compostos do metabolismo secundário, consistindo, principalmente, de taninos condensados e outros compostos fenólicos (CORK & KROCKENBERGER, 1991). Os extratos proteicos obtidos no presente estudo não mostraram efeitos larvicidas.

Neste estudo, foi observada ação de extratos proteicos de *L. leucocephala* em ovos de nematoides, e essa ação pode estar correlacionada com a elevada atividade de protease e quitinase destes extratos. Acredita-se que o mecanismo de ação possa variar de acordo com o estágio de desenvolvimento do nematoide e, conseqüentemente, com a diferença de proteínas presentes na cutícula dos ovos e larvas. Novos estudos devem ser realizados a fim de determinar os efeitos ovicidas de proteínas purificadas de plantas, bem como estabelecer o mecanismo de ação destas proteínas, visando descobrir novos tratamentos contra nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes.

5. Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de bolsa para L. M. Costa-Júnior, e a CAPES (Agência Brasileira Federal para suporte e avaliação da pós-graduação) pela bolsa de estudos para S. A. Araújo e S. G. Lopes. Agradecemos, também, ao CNPq e FAPEMA (Fundação de Pesquisa do Estado do Maranhão) pelo apoio financeiro.

6. Referências

Abe M, Abe K, Kuroda M, Arai SCK. Cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. *Eur J Biochem* 1992; 209(3): 933–937.

Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Capetillo-Leal C, Brunet S, Hoste H. Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of

larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Vet Parasitol* 2008; 153(1-2): 187-192.

Bahuaud D, Montellano CMO, Chauveau S, Prevot F, Torres-Acosta F, Fouraste I, Hoste H. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitol* 2006; 132(4): 545–554.

Bizimenyenra ES, Githiori JB, Eloff JN, Swan GE. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extract on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Parasitol* 2006; 142(3-4): 336–343.

Boller T, Gurr SJ, McPherson MJ, Bowles DJ. Biochemical analysis of chitinases and β -1,3-glucanase. In: Gurr SJ, McPherson MJ, Bowles DJ. *Molecular Plant Pathology*. New York: IRL Press; 1992; 23-29.

Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–254.

Buttle DJ, Behnke JM, Bartley Y, Elsheikha HM, Bartley DJ, Garnett MC, Donnan AA, Jackson F, Lowe A, Duce IR. Oral dosing with papaya latex is an effective anthelmintic treatment for sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Parasit Vectors* 2011; 4(36): 1-11.

Carlini CR, Grossi-de-Sá MF. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 2002; 40(11): 1515-1539.

Cezar AS, Catto JB, Bianchin I. Controle alternativo de nematoides gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. *Ciênc Rural* 2008; 38(7): 2083-2091.

Cork SJ, Krockenberger AK. Methods and pitfalls of extracting condensed tannins and other phenolics from plants: Insights from investigations on *Eucalyptus* leaves. *J Chem Ecol* 1991; 17(1): 123-134.

Cunha FR, Oliveira DF, Campos VP. Extratos vegetais com propriedades nematicidas e purificação do princípio ativo do extrato de *Leucaena leucocephala*. *Fitopatol bras* 2003; 28(4): 438-441.

Egualé T, Tilahun G, Debella A, Feleke A, Makonnen E. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contortus*. *J Ethnopharmacol* 2007; 110(3): 428–33.

GraphPad Software, Inc. 2007. Prism (data analysis software system), version 5. Disponível em: <<http://www.graphpad.com>>.

Hernández-Villegas MM, Borges-Argáez R, Rodríguez-Vivas RI, Torres-Acosta JFJ, Méndez-Gonzalez M, Cáceres-Farfan M. Ovicidal and larvicidal activity of the crude

extracts from *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 2011; 179(1-3): 100–106.

Hounzangbe-Adote MS, Paolini V, Fouraste I, Moutairou K, Hoste H. In vitro effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Res Vet Sci* 2005; 78(2): 155–160.

Huber M, Cabib E, Miller LH. Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88(7): 2807-2810.

Izuhara K, Kanaji S, Arima K, Ohta S, Shiraishi H. Involvement of cysteine protease inhibitors in the defense mechanism against parasites. *Med Chem* 2008; 4(4): 322-327.

Lawrence PK, Kowndal KR. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electron J Biotechn* 2002; 5(1): 93-109.

Leger RJ, Staples RC, Roberts DW. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. *J Invert Pathol*. 1993; 61(1): 81-84.

Lim TK. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants, Part One - Fruits*. New York: Springer; 2012.

Londershausen M, Turberg A, Bieseler B, Lennartz M, Peter MG. Characterization and Inhibitor Studies of Chitinases from a Parasitic Blowfly (*Lucilia cuprina*), a Tick (*Boophilus microplus*), an Intestinal Nematode (*Haemonchus contortus*) and a Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Pestic Sci* 1996; 48(4): 305–314.

Luoga W, Mansur F, Buttle DJ, Duce IR, Garnett MC, Lowe A, Behnke JM. The relative anthelmintic efficacy of plant-derived cysteine proteinases on intestinal nematodes. *J Helminthol* 2013; 89(2): 1-10.

Mansfield LS, Gamble HR, Fetterer RH. Characterization of the egg shell of *Haemonchus contortus* - I. Structural components. *Comp Biochem Physiol B*. 1992; 103(3): 681-686.

Marie-Magdeleine C, Mahieu M, D'Alexis S, Philibert H, Archimede L. In vitro effects of *Tabernaemontana citrifolia* extracts on *Haemonchus contortus*. *Res Vet Sci* 2010; 89(1): 88–92.

Martin, P. Beyond the next generation of therapeutic proteins. *Protein Eng* [online] 2006. [Cited 2015 mar 23]. Available from: <http://biotech-online.com/uploads/tx-ttproducts/datasheep/beyond-the-next-generation-of-therapeutic-proteins.pdf>.

Molano J, Durán A, Cabib E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Anal Biochem*. 1977 Dec;83(2):648-56.

Nehdi IA, Sbihi H, Tan CP, Al-Resayes SI. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit seed oil: Characterization and uses. *Ind Crop Prod* 2014; 52: 582– 587.

Oliveira LMB, Bevilaqua CML, Macedo ITF, Morais SM, Monteiro MVB, Campello CC, Ribeiro WLC, Batista EKF. Effect of six tropical tanniferous plant extracts on larval exsheathment of *Haemonchus contortus*. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20(2): 155-160.

Pandey VC, Kumar A. *Leucaena leucocephala*: an underutilized plant for pulp and paper production. *Genet Resour Crop Ev* 2013; 60: 1165–1171.

Pesquet E. Plant proteases – from detection to function. *Physiol Plantarum* 2012; 145(1): 1–4.

Phiri AM, Pomerai D, Buttle DJ, Behnke JMB. Developing a rapid throughput screen for detection of nematicidal activity of plant cysteine proteinases: the role of *Caenorhabditis elegans* cystatins. *Parasitol* 2013; 141(2): 1-17.

Prasad JVNS, Korwar GR, Rao KV, Mandal UK, Rao GR, Srinivas I, et al Optimum stand density of *Leucaena leucocephala* for wood production in Andhra Pradesh, Southern India. *Biomass Bioenerg* 2011; 35(1): 227–235.

Reissig JL, Strominger JL & Leloir LF. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem* 1955; 217:959-66.

Rhoads ML, Fetterer RH. Biochemical and immunochemical characterization of 125I-labeled cuticle components of *Haemonchus contortus*. *Mol & Biochem. Parasitol* 1990; 42: 155-164.

Rhoads ML, Fetterer RH, Romanowski RD. A developmentally regulated hyaluronidase of *Haemonchus contortus*. *J Parasitol* 2000; 86(5): 916-921.

Roberts FHS, O'Sullivan PJ. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastrointestinal tract of cattle. *Aust J Agric Res* 1950; 24(1): 99-102.

Rogers WP, Brooks F. The mechanist of hatching of eggs of *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 1977; 7(1): 61-65.

Sahabuddin M, Toyoshima T, Aikawa M, Kaslow D. Transmission blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90(9): 4266-4270.

Salles HO, Braga ACL, Nascimento MTSC, Sousa AMP, Lima AR, Vieira LS, et al. Lectin, hemolysin and protease inhibitors in seed fractions with ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. *Braz J Vet Parasitol* 2014; 23(2): 136-143.

Shamansky LM, Pratt D, Boisvenue RJ, Cox GN. Cuticle collagen genes of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans* are highly conserved. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 37(1): 73-85.

Sharma N, Sharma KP, Gaur RK, Gupta VK. Role of chitinase in plant defense. *Asian J Chem* 2011; 6(1): 29-37.

Silva MR, Silva MAAP. Fatores Antinutricionais: Inibidores de proteases e lectinas. *Rev Nutr* 2000; 13(1): 3-9.

Steppek G, Lowe AE, Buttle DJ, Duce IR, Behnke JM. In vitro and in vivo anthelmintic efficacy of plant cysteine proteinases against the rodent gastrointestinal nematode, *Trichuris muris*. *Parasitol* 2006; 132(5): 681–689.

Steppek G, Curtis RHC, Kerry BR, Shewry PR, Clark SJ, Lowe A, et al. Nematicidal effects of cysteine proteinases against sedentary plant parasitic nematodes. *Parasitol*, 2007a; 134(12): 1831–1838.

Steppek G, Lowe AE, Buttle DJ, Duce IR, Behnke JM. The anthelmintic efficacy of plant-derived cysteine proteinases against the rodent gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, in vivo. *Parasitol* 2007b; 134(10): 1409–1419.

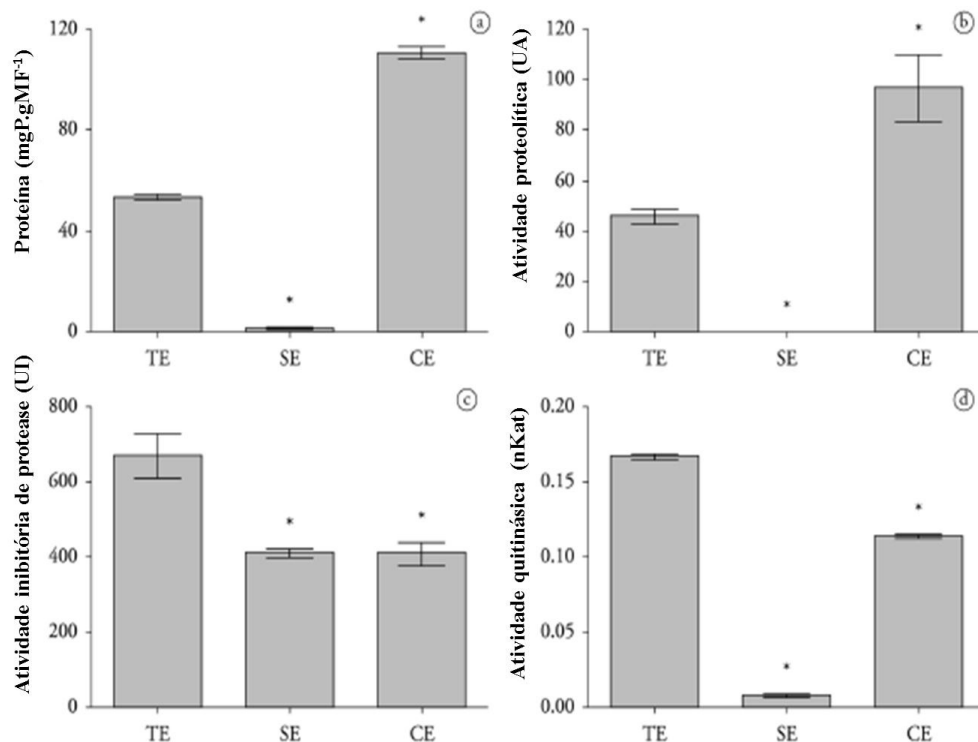
Steppek G, Lowe AE, Buttle DJ, Duce IR, Behnke JM. Anthelmintic action of plant cysteine proteinases against the rodent stomach nematode, *Protospirura muricola*, in vitro and in vivo. *Parasitol* 2007c; 134(1): 103-112.

Torres-Acosta JFJ, Hoste H. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Res* 2008; 77(2-3): 159-173.

Williamson AL, Brindley PJ, Knox DP, Hotez PJ, Loukas A. Digestive proteases of blood-feeding nematodes. *Parasitol* 2003; 19(9): 417-423.

Xavier-Filho J, Campos FAP, Maria AP, Ary MB, Silva CP, Carvalho MMM, et al. Poor correlation between levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/ susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. *J Agric Food Chem* 1989; 37(4): 1139-1143.

Figura 1. (a) Concentração de proteína (mgP/gMF⁻¹) de extratos de sementes de *Leucaena leucocephala*. (b) Atividade proteolítica dos extratos proteicos expressos em UA (Unidade de Atividade). (c) Análise da atividade inibidora de protease dos extratos proteicos expressos em UI (Unidade de Inibição). (d) Atividade de quitinase dos extratos proteicos expressos como nkat (nanokatal)



TE: extrato total, SE: extrato de casca e CE: extrato de cotilédone. Os dados das três amostras estão expressos em média \pm desvio. Os asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de SE e CE em relação a TE.

Tabela 1. Eficiência dos extratos proteicos de *Leucaena leucocephala* sobre o nematoide gastrointestinal *Haemonchus contortus*

[] mg de proteína.mL ⁻¹	Extrato		
	TE	SE	CE
Controle (tampão)	0.00 \pm 1.11 Aa	0.00 \pm 1.11 Aa	0.00 \pm 1.11 Aa
0.8	99.17 \pm 0.46 Bb	-	83.38 \pm 3.06 Cb
0.4	56.64 \pm 7.32 Bc	0.85 \pm 1.12 Aa	18.45 \pm 5.43 Cc
0.2	0.00 \pm 0.13 Aa	0.07 \pm 2.31 Aa	0.00 \pm 6.15 Aa
0.1	0.00 \pm 2.41 Aa	0.49 \pm 1.78 Aa	0.00 \pm 0.50 Aa
0.05	0.00 \pm 1.00 Aa	4.37 \pm 1.66 Aa	0.00 \pm 3.03 Aa
EC 50	0.33 (0.29-0.38)	-	0.48 (0.40-0.57)

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$): letras maiúsculas comparam eclosão dos ovos entre os extratos, e as letras minúsculas comparam os valores entre concentrações e controle. TE: extrato total; SE: extrato de casca; CE: extrato de cotilédone.

Efeito anti-helmíntico *in vitro* de frações proteicas de *Spigelia anthelmia* contra *Haemonchus contortus*

Efeito anti-helmíntico *in vitro* de frações proteicas de *Spigelia anthelmia* contra *Haemonchus contortus*

In vitro anthelmintic effect of protein fractions of *Spigelia anthelmia* against *Haemonchus contortus*

Sandra Alves de Araújo^a, Alexandra Martins dos Santos Soares^a, Carolina Rocha e Silva^b, Eduardo Bezerra de Almeida Júnior^c, Cláudia Quintino da Rocha^d, André Teixeira da Silva Ferreira^e, Jonas Perales^e, Livio Martins Costa Júnior^{b*}

^aLaboratório de Bioquímica Vegetal, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, nº 1966, CEP 65080-805, São Luís MA, Brasil;

^bLaboratório de Controle de Parasitos, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, nº 1966, CEP 65080-805, São Luís MA, Brasil;

^cLaboratório de Estudos Botânicos, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, nº 1966, CEP 65080-805, São Luís MA, Brasil;

^dLaboratório de Estudos Avançados em Fitomedicamentos, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, nº 1966, CEP 65080-805, São Luís MA, Brasil;

^eLaboratório de Toxinologia, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, nº 4365, CEP 21045-900, Rio de Janeiro, Brasil;

*Autor para Correspondência:

e-mail: livio.martins@ufma.br.

Resumo

Os nematoides gastrointestinais são atualmente o principal problema de saúde e bem-estar animal. O tratamento anti-helmíntico desses parasitos ocorre principalmente pelo uso de produtos químicos. Alternativamente, os compostos bioativos produzidos pelas plantas revelam-se promissores para o desenvolvimento de novos produtos anti-helmínticos. Este estudo tem como objetivo relatar a atividade anti-helmíntica de extratos proteicos de *Spigelia anthelmia* sobre o nematoide gastrointestinal *Haemonchus contortus*. As partes das plantas, separadas em folhas, caules e raízes, foram lavadas com água destilada, liofilizadas e subsequentemente trituradas. A extração das proteínas foi realizada em tampão fosfato de sódio (75 mM, pH 7.0). Cada extrato foi fracionado por sulfato de amônio (0-90%) e dialisado exaustivamente. As frações resultantes foram denominadas: LPF (fração proteína folha), SPF (fração proteica caule) e RPF (fração proteica raiz) e o teor de proteína e as atividades dos extratos e frações foram realizadas. Foram realizados ensaios de eclosão de ovos (EHA), ensaio de desembainhamento larvar (LEA) e ensaio de inibição de migração larvar (LMIA) utilizando *H. contortus*. A análise proteômica e o perfil cromatográfico das frações foram realizados para identificar proteínas e possíveis metabólitos secundários presentes. As frações de *S. anthelmia* L. inibiram a eclosão dos ovos, sendo a LPF a mais efetiva (EC_{50} 0,17 mg mL⁻¹). Em LEA, o SPF apresentou maior eficiência em relação aos demais (EC_{50} 0,25 mg mL⁻¹). As frações obtidas de raiz, caule e folha também causaram uma redução no número de larvas recuperadas no LMIA com EC_{50} 0,11; 0,14 e 0,21 mg mL⁻¹, respectivamente. A análise proteica indicou a existência de proteínas de defesa de plantas em frações de *S. anthelmia*, incluindo protease, inibidor de protease, quitinase e outros. Os metabólitos secundários estavam ausentes nas frações proteicas de *S. anthelmia*. Estes resultados sugerem que as proteínas presentes em *S. anthelmia* se tornam promissoras no controle do nematoide gastrointestinal *H. contortus*.

Palavras-chave: Produtos naturais, proteína vegetal, nematoide, pecuária.

1. Introdução

Nematoide gastrintestinal é atualmente o principal problema de saúde e bem-estar animal [1]. Doenças causadas por parasitos gastrintestinais em pequenos ruminantes vêm gerando perdas significativas na produção desses animais no Brasil e no mundo [2,3].

Haemonchus contortus é a espécie mais importante entre os parasitos devido sua ocorrência generalizada, prejuízos e alta patogenicidade [2,4]. O tratamento anti-helmíntico destes parasitos se dá principalmente pela utilização de produtos químicos comercialmente disponíveis [5]. O aumento da resistência causou grandes impactos econômicos na pecuária global [6,7]. Alternativamente, os compostos bioativos produzidos pelas plantas revelam-se promissores para o desenvolvimento de novos produtos anti-helmínticos.

Spigelia anthelmia é uma espécie herbácea da família Loganiaceae, comumente conhecida como "erva-lombrigueira", usada pela medicina popular no Brasil devido às suas diferentes propriedades, incluindo contra nematoides gastrointestinais [8]. Estudos *in vitro* e *in vivo* confirmam a eficácia de *S. anthelmia* no controle de *H. contortus* [9,10], mas, apesar da grande diversidade de compostos presentes nas plantas, apenas os metabólitos secundários foram apontados como os principais responsáveis pela ação biológica [11,12]. Além da evidência da atividade anti-helmíntica dos extratos de *S. anthelmia*, uma busca por compostos proteicos podem melhorar a extração e conseqüentemente se tornar mais barata.

Proteínas de defesa vegetal têm apresentado propriedades nematicidas tornando-se potenciais no desenvolvimento de novos produtos para o controle de *H. contortus* [13,14,15]. No entanto, poucos estudos foram realizados com proteínas vegetais para controlar os nematoides. Neste contexto, este estudo tem como objetivo relatar a atividade anti-helmíntica de frações proteicas de *S. anthelmia* em ovos e larvas infectantes do nematoide gastrintestinal *H. contortus*.

2. Materiais e métodos

2.1 Material vegetal

Espécimes de *S. anthelmia* foram coletados em São Luís (2°33'14" S e 44°18'20" W), estado do Maranhão, Brasil. As amostras vegetais foram enviadas ao Herbário do Maranhão - MAR para identificação botânica (voucher-5626). O material vegetal foi lavado cuidadosamente com água destilada e as partes da planta foram seccionadas em folhas, caules e raízes e imediatamente congeladas em liofilizador [16]. O material vegetal foi triturado e foi armazenado a -4 °C para análises posteriores.

2.2 Preparação dos extratos e frações proteicas de *S. anthelmia*

As proteínas solúveis foram extraídas das amostras vegetais em pó na presença de polivinilpirrolidona (PVPP) a 1% (m/v), para ajudar na remoção de compostos fenólicos [17], com tampão de fosfato de sódio (75 mM, pH 7,0) contendo 75 mM de NaCl, numa proporção de 1:20 (m/v). Extratos de folhas, caules e raízes foram obtidos sob agitação moderada, a 4 °C por 1 h. Após extração, as amostras foram centrifugadas a 15.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram centrifugados sob as mesmas condições. Os sobrenadantes resultantes foram dialisados em membrana com exclusão molecular de 14 kDa contra água destilada numa proporção de 1:50 (v/v) e fracionados com sulfato de amônio a 90% de saturação [18]. Em banho de gelo e sob agitação moderada, adicionou-se, gradualmente, o sulfato de amônio. Após agitação, as amostras foram deixadas em repouso durante 12 horas a 8 °C e, depois, centrifugadas a 4 °C, 15.000 x g durante 30 minutos. Após a remoção do sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso e submetido à diálise exaustiva contra tampão de extração na proporção 1:50 (v/v), durante 24h com sete trocas, para remoção de compostos orgânicos com massa molecular inferior a 14 kDa,. Após obtenção das frações proteicas, elas foram denominadas de: fração proteica folha (LPF), fração proteica caule (SPF) e fração proteica raiz (RPF).

2.3 Teor proteico e atividade de protease, inibidor de protease, quitinase e lectina

O teor de proteínas solúveis foi determinado pelo método descrito utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão, preparada em diferentes concentrações [19].

A atividade proteolítica foi obtida a partir da hidrólise da azocaseína [20]. Uma unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorvância em 420 nm a $0,01 \text{ mL}^{-1}$ após 60 min de reação. A atividade específica foi expressa como unidade de atividade proteolítica por miligrama de proteína (UA/mgP). A atividade inibitória de protease cisteínica foi determinada pela medida da inibição da atividade da papaína, usando benzoil-arginina-naftilamida (BANA) como substrato [21]. Uma unidade de atividade inibitória (UI) foi definida como a diminuição de 0,01 unidade de absorvância a 540 nm por minuto em comparação com o controle (atividade de papaína na ausência do inibidor). A atividade específica foi expressa como unidade de atividade inibitória por miligrama de proteína (UI/mgP).

A determinação da atividade quitinolítica foi determinada utilizando um procedimento colorimétrico que detecta N-acetil-D-glucosamina (NAG) produzida pela ação hidrolítica combinada de quitinases e β -glucuronidase sobre a quitina coloidal utilizada como substrato. A quitina coloidal utilizada no ensaio foi previamente preparada usando ácido acético anidrido [22]. A absorvância foi lida a 585 nm em espectrofotômetro. A atividade de quitinase foi calculada como nanokatal (nkat) por miligrama de proteína [23,24]. Um nanokatal foi definido como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 nmol de produto de reação por segundo (s).

A atividade de lectina foi avaliada por diluição em série das amostras, empregando eritrócitos de coelho (2%) [25]. Uma unidade de hemaglutinação (UH) foi definida como o inverso da maior diluição da amostra ainda capaz de promover aglutinação dos eritrócitos, visualizada a olho nu. A atividade específica foi calculada como a razão do título pela concentração de proteínas da amostra em miligrama por mililitro.

2.4 Ensaios biológicos

2.4.1 Obtenção de nematoides

Os ovos e as larvas de terceiro estágio (L₃) de *H. contortus* foram recuperados das fezes de ovinos infectados experimentalmente. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Maranhão e foram aprovados por esta comissão sob o número de protocolo 23115018061 / 2011-11.

2.4.2 Ensaio de eclodibilidade de ovos (EHA)

Ovos de *H. contortus* foram recuperados a partir das fezes de ovelhas infectadas artificialmente [26]. A atividade inibitória de eclosão de ovos das amostras foi avaliada segundo metodologia já descrita [27]. Utilizando placas estéreis de 96 poços, 100 µL da amostra foram adicionados e, em seguida, aproximadamente 100 ovos, em cada poço. As amostras foram testadas em concentrações de proteínas previamente padronizadas (0,062; 0,125; 0,25; 0,5; 1 e 2 mg mL⁻¹) em quadruplicata. Como controle, 100 µL de tampão fosfato de sódio-potássio 10 mM, pH 7.2, contendo 125 mM de NaCl, foram utilizados. Em seguida, todas as placas foram identificadas e colocadas em estufa (27 °C; 80% UR) por 48 horas. Após este período, 50 µL de lugol foram adicionados em cada poço e os ovos e larvas eclodidas quantificadas para o cálculo da porcentagem de inibição da eclodibilidade larvar.

2.4.3 Ensaio de desembainhamento larvar (LEA)

O ensaio foi realizado segundo metodologia descrita [27]. Larvas viáveis foram imersas em diferentes concentrações de proteína, previamente padronizadas (0,075; 0,15; 0,3; 0,6; 1,2 mg mL⁻¹), e acondicionadas em estufa (27 °C; 80% UR) durante 3 horas. Após este tempo, as larvas foram lavadas em água destilada durante 3 minutos a 2.540 x g. Logo após a lavagem, o desembainhamento larvar foi induzido por adição de solução de hipoclorito de sódio (contendo 2,5% de cloro ativo) 2%. A cada 20 minutos, o desembainhamento foi interrompido com adição de 30 µL de lugol. O ensaio foi acompanhado durante 60 minutos. Para cada tratamento, o ensaio foi repetido quatro vezes. Como controle, tampão fosfato de

sódio-potássio 10 mM, pH 7.2, contendo 125 mM NaCl foi utilizado. A cinética de desembainhamento das larvas nos diferentes tratamentos foi, então, monitorizada por observação microscópica (Primo Vert) com ampliação de 100x. As percentagens de larvas desembainhadas foram quantificadas.

2.4.4 Ensaio de inibição da migração larvar (LMIA)

A avaliação da inibição da migração larvar foi realizada através de metodologia já descrita [28]. Inicialmente as larvas de *H. contortus* foram submetidas ao processo de desembainhamento pelo contato com hipoclorito de sódio (contendo 2,5% de cloro ativo) (2% v/v). Após desembainhamento, as larvas foram centrifugadas em água destilada durante 5 minutos a 407 x g, para remoção do sobrenadante. As larvas foram ressuspensas em água destilada e novamente centrifugadas. Este processo foi repetido por mais duas vezes, até a remoção total do hipoclorito de sódio. As larvas desembainhadas foram ajustadas para aproximadamente 1000 larvas/mL. Foram adicionados em tubos do tipo eppendorf 100 µL da suspensão larval (aproximadamente 100 larvas) e acrescido de 1000 µL de cada amostra nas concentrações de proteínas a serem testadas (0,03; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 mg mL⁻¹). Foram incubadas durante 2h em estufa a 27 °C. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 1.500 x g durante 10 min e o sobrenadante foi removido, reduzindo o volume em aproximadamente 300 µL.

Utilizando placas de cultura, 200 µL das amostras nas concentrações descritas anteriormente foram adicionados nos poços e, em seguida, filtros adaptados com malhas foram submersas em cada poço. Foram adicionados 50 µL de suspensão larval sobre o filtro correspondente e novamente foram incubadas por 2h em estufa a 27 °C. Ao término do tempo, os filtros foram removidos cuidadosamente e lavados para retiradas das larvas contidas na malha. Em cada poço da placa de cultura foi adicionado 30 µL de lugol e usando um microscópio invertido (Primo Vert) com ampliação de 100x, as larvas de cada poço e de cada filtro foram contabilizadas. O ensaio foi realizado em quadruplicata. O tampão fosfato de sódio-potássio 10 mM, pH 7.2, contendo 125 mM de NaCl foi utilizado como controle.

2.5 Análise da proteômica (ESI-LC-MS/MS)

Inicialmente, alíquotas das frações de *S. anthelmia* foram digeridas enzimaticamente com tripsina. Cada amostra foi analisada em coluna RP (fase reversa) de 24 cm acoplada ao espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific), usando o sistema nLC-Easy II (Thermo scientific, USA). Em seguida, as amostras foram aplicadas em coluna pré-equilibrada em 0,1% (v/v) de ácido fórmico (eluente A), e, posteriormente, os peptídeos foram eluídos com um gradiente de 2 a 40% de acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico (v/v) (eluente B). Sequencialmente, foram submetidos à fragmentação por dissociação induzida por colisão (Collision Induced Dissociation, CID) e depois analisados no Linear Trap Quadrupole (LTQ) no modo MS/MS. Os dados obtidos foram analisados em triplicatas, utilizando o software Xcalibur (versão 2.0.7). As proteínas identificadas foram avaliadas utilizando o banco de dados NCBI-nr (20140510).

2.6 Análise qualitativa de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV)

Para detecção de metabólitos secundários nas amostras, a análise foi realizada por um sistema de HPLC de modelo Shimadzu (Shimadzu Corp., Quioto, Japão), que consiste de um módulo de distribuição de solvente com uma bomba de movimento alternado de duplo êmbolo e detector de UV-VIS (SPA-10A). A coluna utilizada foi de marca Luna 5 µm, C18, 100 A (250 µm x 4,6 µm). Os solventes de eluição utilizados foram ácido acético 2% (v/v) (solução A) e metanol (solução B). As amostras foram eluídas de acordo com o seguinte gradiente: 95% A / 5% B durante 30 minutos. Foi utilizado um fluxo de 1 mL min⁻¹, durante 35 minutos. A temperatura da coluna foi de 20 °C. Foi injetado um volume de 20 µL de amostra. Os dados foram coletados e processados usando software LC Solution (Shimadzu). O cromatograma foi registrado a 254 nm.

2.7 Análise estatística

Os dados bioquímicos foram obtidos em triplicata e expressos como média ± desvio padrão. O método Probit (LeOra Software Company PoloPlus 2.0) foi usado para calcular a Concentração Efetiva (EC) de cada amostra para atividade biológica

(em ovos e larvas) e expressa como média e intervalo de confiança (95%). Valores de EC_{50} sem sobreposição no intervalo de confiança foram considerados significativamente diferentes [29]. Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism, v. 6.0 (GraphPad Software Inc., 2007).

3. Resultados

3.1 Teor proteico e atividade de proteínas relacionadas à defesa de plantas nas frações

Após obtenção dos extratos totais de folhas, caules e raízes de *S. anthelmia* e fracionamento por sulfato de amônio, determinou-se o teor de proteínas de cada amostra. O teor de proteína por grama de massa fresca de LPF, SPF e RPF foi de 34,47; 6,12 e 5,52 mgP/gMF⁻¹, respectivamente.

A atividade proteolítica foi detectada em todas as frações, com atividade mais expressiva em LPF e RPF (569,13 ± 23,1 e 219,42 ± 10,2 AU, respectivamente). Embora a inibição da atividade da protease tenha sido detectada em LPF (111,31 ± 17,3 UI), SPF (80,04 ± 6,0 UI) e RPF (117,21 ± 15,0 UI), a atividade da quitinase foi muito baixa e a lectina não foi detectada (Tabela 1).

3.2 Identificação de proteínas nas frações

Com base na espectrometria de massa das frações de *S. anthelmia*, foram identificadas 195, 227 e 142 proteínas em folhas, caules e raízes, respectivamente (Figura 1S). As proteínas relacionadas à defesa de plantas que poderiam exercer efeitos anti-helmínticos foram destacadas (Tabela 2).

A quitinase e protease foram identificadas como estando presentes em todas as amostras. Embora as proteases aspárticas e cisteínas estivessem presentes em todas as amostras, a LPF também incluía uma protease serina. As ribonucleases foram identificadas em SPF e RPF. O inibidor de protease foi identificado apenas em RPF. A HPLC-UV revelou que todas as frações estavam livres de compostos metabólicos secundários (Figura 2S).

3.3 Ensaios *in vitro* contra *H. contortus*

Todas as frações apresentaram eficácia sobre a inibição da eclodibilidade de ovos de *H. contortus* com EC₅₀ de 0,17, 0,65 e 0,79 mg mL⁻¹ em LPF, SPF e RPF, respectivamente (Tabela 3).

A ação das proteínas no ensaio de desembainhamento de larvas foi observada para LPF (EC₅₀ 0,47 mg mL⁻¹) e RPF (EC₅₀ 0,78 mg mL⁻¹) (Tabela 3). O SPF a 1,2 mg mL⁻¹ inibiu apenas 7,90% do desembainhamento das larvas após 60 minutos de incubação (Figura 3SB). As frações também inibiram a migração larval com EC₅₀ variando de 0,11 a 0,21 mg mL⁻¹ (Tabela 3).

4. Discussão

Apesar da maioria dos estudos relatarem a ação de plantas sobre o nematoide *H. contortus*, estes associam sua atividade a presença de compostos do metabolismo secundário [11,12]. *S. anthelmia* é conhecida pela sua atividade anti-helmíntica incluindo contra *H. contortus* [9,10]. No entanto, neste estudo, a ação de proteínas de *S. anthelmia* contra *H. contortus* foi verificada pela primeira vez, abrindo um novo campo de pesquisa envolvendo proteínas de plantas com potencial contra este parasito.

As frações de folhas, caule e raízes de *S. anthelmia* apresentaram conteúdo proteico total diferentes, 34,47; 6,12 e 5,52 mgP/gMF⁻¹, respectivamente. Estes resultados são atribuídos à diferença na composição proteica em cada parte da planta. O teor proteico na planta é afetado pelas variações climáticas e geográficas, pela disponibilidade de nutrientes na água e no solo [30]. Assim, a expressiva concentração de proteína observada nas frações obtidas de folhas pode estar correlacionada à maior exposição aos níveis de estresse biótico e abiótico no ambiente [31,30].

As proteínas das frações de *S. anthelmia* relacionadas ao mecanismo de defesa foram identificadas por espectrometria de massa (Tabela 2). A protease e quitinase foram identificadas como estando presentes em todas as frações proteicas (Tabela 2). As enzimas proteolíticas estão envolvidas em uma ampla variedade de funções e processos fisiológicos, incluindo a hidrólise de proteínas digestivas

essenciais de insetos herbívoros, fitonematoides e microrganismos patogênicos [32]. Em nosso estudo, a atividade da protease foi detectada em LPF, SPF e RPF (Tabela 1) e confirmada por espectrometria de massa (Tabela 2). As proteases atuam sobre a cutícula do parasito, causando danos severos, resultando na morte do nematoide [33,34].

A cutícula do nematoide é uma estrutura complexa composta principalmente de proteínas, carboidratos e lipídios. O constituinte principal da cutícula dos nematóides é o colágeno [35,36]. A perda da bainha pelas larvas do terceiro estágio ocorre em respostas a estímulos como pH, temperatura e presença de dióxido de carbono no ambiente que induzem as enzimas de secreção que promovem a digestão da bainha e liberação das larvas [37,38,39]. Assim, a ação das frações de *S. anthelmia* sobre as larvas pode estar associada à presença de proteases que pudessem hidrolisar importantes proteínas necessárias para o processo de desembainhamento e/ou migração das larvas. Esta hipótese é reforçada com os nossos resultados quando os valores de EC_{50} variaram de 0,11 a 0,21 mg mL⁻¹ para LMIA e 0,47 a 0,78 mg mL⁻¹ para LEA (Tabela 3).

De outro modo, à medida que as proteases dos nematoides degradam a membrana do ovo durante a incubação dos ovos [35], os inibidores da protease podem estar associados com a inibição total ou parcial de enzimas proteolíticas essenciais para o desenvolvimento do parasito. De forma interessante, embora a atividade de inibidor de protease tenha sido detectada em todas as frações de proteína (Tabela 1), esta proteína foi identificada por espectrometria de massa apenas em RPF (Tabela 2). Algumas proteínas são conhecidas como bifuncionais porque têm múltiplos domínios e têm funções diferentes [40]. A presença de proteínas bifuncionais nas frações de *S. anthelmia* pode ter influenciado a detecção na atividade de inibidores de protease em LPF e SPF nos ensaios *in vitro*. Além disso, a análise proteômica mostrou a presença de proteínas desconhecidas, que também podem ter atuado no resultado (Figura 1S).

Adicionalmente, as quitinases foram identificadas nas frações (Tabela 2), mas a atividade desta enzima na fração não foi elevada (Tabela 1). As quitinases são enzimas que degradam a quitina, um componente importante de cascas de ovos de nematoides [41,42]. Nos nematoides, a quitinase degrada a quitina presente na

cutícula dos ovos e larvas do parasito inibindo o seu desenvolvimento ou conduzindo à morte (35,43). Outra classe de proteína envolvida na defesa da planta é a ribonuclease (RNAse), uma proteína que participa do processamento e degradação do RNA. Embora os mecanismos não sejam elucidados, a RNAse participa em respostas complexas de defesa de plantas a patógenos, principalmente contra fungos patogênicos [44]. A lectina foi identificada por espectrometria de massa no SPF (Tabela 2), embora a atividade hemaglutinante não tenha sido observada em ensaios *in vitro* (Tabela 1), possivelmente devido à baixa quantidade ou ainda está inativa na amostra. A presença de lectinas em plantas tem sido associada ao seu papel protetor, uma vez que estas moléculas dificultam a penetração de fitonematoides em raízes ao interagir com estruturas sensoriais do parasito, reduzindo sua capacidade de locomoção [45].

Diferenças estruturais existentes na cutícula do ovo e de larvas infectantes dos nematoides podem interferir na bioatividade do produto [35]. O extrato metanólico de *M. esculenta* atuou sobre o desenvolvimento larval, mas não exibiu efeito sobre ovos, na migração larval e na motilidade dos adultos [46]. Diferenças na cutícula de ovos e larvas de *H. contortus*, bem como os tipos de proteínas presentes alteram o mecanismo de ação dos extratos proteicos de *L. leucocephala* [47]. As frações proteicas de *S. anthelmia* exerceram esse efeito durante mais de um estágio do ciclo de vida do parasito de *H. contortus* (Tabela 3). Esta observação é relevante porque o estudo da composição cuticular da membrana do ovo e das larvas dos nematoides é uma ferramenta importante para a compreensão da penetração de substâncias antiparasitárias.

Estudos *in vivo* utilizando extratos etanólicos e aquosos de *S. anthelmia* em nematoides gastrointestinais *Strongyloides* spp., *Oesophagostomum* spp., *Trichuris* spp., *Haemonchus* spp., e *Trichostrongylus* spp. de ovinos tem mostrado redução nos ovos fecais e sobrevivência de larvas de terceiro estágio [10]. No presente estudo, foi demonstrado que as frações proteicas obtidas de *S. anthelmia*, livre de compostos do metabolismo secundário, apresentaram efeito anti-helmíntico em relação aos ovos e larvas de *H. contortus*. A abordagem utilizada para obter as frações proteicas é barata, rápida, abrangente e facilmente reproduzível. Estudos adicionais devem ser realizados para entender o papel das proteínas bioativas de

plantas contra *H. contortus*, bem como para identificar o provável mecanismo de ação dessas proteínas para contribuir para a descoberta de novos fármacos eficientes *in vivo* contra o nematoide *H. contortus*.

5. Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de uma bolsa para L. M. Costa-Júnior, e, CAPES (Agência Brasileira Federal para suporte e avaliação da pós-graduação) pela bolsa de estudos para S. A. Araújo e C. R. Silva. Agradecemos também CNPq e FAPEMA (Fundação de Pesquisa do Estado do Maranhão) pelo apoio financeiro.

6. Referências

1. Elandalousi RB, Akkari H, B'Chir F, Gharbi M, Mhadhbi M, Awadi S. et al. *Thymus capitatus* from Tunisian arid zone: chemical composition and in vitro anthelmintic effects on *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol. 2013; 197: 374-378.
2. Roeber F, Jex AR, Gasser RB. Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. Biotechnol. Adv. 2013; 31: 1135-1152.
3. Salgado JA, Santos CP. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2016; 25: 3-17.
4. Rose H, Hoar B, Kutz SJ, Morgan ER. Exploiting parallels between livestock and wildlife: predicting the impact of climate change on gastrointestinal nematodes in ruminants. Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 2014; 15: 209-219.
5. Oliveira LMB, Bevilaqua CML, Macedo ITF, Morais SM, Monteiro MVB, Campello CC, et al. Effect of six tropical tanniferous plant extracts on larval exsheathment of *Haemonchus contortus*. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2011; 20: 155-160.
6. Irum S, Ahmed H, Mukhtar M, Mushtaq M, Mirza B, Donskow-Lysoniewsk K, et al. Anthelmintic activity of *Artemisia vestita* Wall ex DC. and *Artemisia maritima* L. against *Haemonchus contortus* from sheep. Vet. Parasitol. 2015; 212: 451-455.

7. Simpraga M, Ljubicic I, Hlede JP, Vugrovecki AS, Marinculic A, Tkalcic S. Alternative approaches for the control of gastrointestinal nematodes in sheep farming: a review. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 2015; 128: 257-270.
8. Nurit K, Agra MF, Basilio IJLD, Baracho GS. Flora da Paraíba, Brasil: Loganiaceae. *Acta Bot. Bras.* 2005; 19: 407-416.
9. Assis LM, Bevilaqua CML, Morais SM, Vieira LS, Costa CTC, Souza JAL. Ovicidal and larvicidal activity in vitro of *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 2003; 117: 43-49.
10. Ademola IO, Fagbemi BO, Idowu SO. Anthelmintic activity of *Spigelia anthelmia* extract against gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitol. Res.* 2007; 101: 63-69.
11. Sandoval-Castro CA, Torres-Acosta JFJ, Hoste H, Salem AZM, Chan-Pérez JI. Using plant bioactive materials to control gastrointestinal tract helminths in livestock. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 2012; 176: 192–201.
12. Martínez-Ortíz-De-Montellano C, Arroyo-López C, Fourquaux I, Torres-Acosta JF, Sandoval-Castro CA, Hoste H. Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich plants under in vivo and in vitro conditions. *Exp. Parasitol.* 2013; 133: 281-286.
13. Ríos-De-Álvarez L, Jackson F, Greer A, Bartley Y, Bartley DJ, Grant G, et al. In vitro screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties. *Vet. Parasitol.* 2012; 25: 390-398.
14. Braga FR, Soares FEF, Araujo JM, Fonseca LA, Hiura E, Garschagen Gava M, et al. Statistical experimental design to assess the influence of enzymes of nematophagous fungi versus helminthes. *Res. Vet. Sci.* 2014; 97: 527-532.
15. Heim C, Hertzberg H, Butschi A, Bleuler-Martinez S, Aebi M, Deplazes P, et al. Inhibition of *Haemonchus contortus* larval development by fungal lectins. *Parasit. Vectors.* 2015; 8: 425.
16. Boss EA, Filho RM, Toledo ECV. Freeze drying process: real time model and optimization. *Chem. Eng. Process.* 2004; 43: 1475-1485.
17. Makkar HPS. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small. Rumin. Res.* 2003; 49: 241-256.
18. Scopes R. Protein purification: Principles and practice. Springer-Verlag, 3 rdedn. New York, 1994.

19. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 7: 248-254.
20. Xavier-Filho J, Campos FAP, Maria AP, Ary MB, Silva CP, Carvalho MMM. et al. Poor correlation between levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivares of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/ susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. *J. Agric. Food. Chem.* 1989; 37: 1139-1143.
21. Abe M, Abe K, Kuroda M, Arai SCK. Corn Kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. *Eur. J. Biochem.* 1992; 209: 933-937.
22. Molano J, Durán A, Cabib E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Anal Biochem.* 1977; 83, 648-56.
23. Boller T, Gurr SJ, Mcpherson MJ, Bowles DJ. Biochemical analysis of chitinases and β -1,3-glucanase. In: Gurr SJ, McPherson MJ, Bowles DJ. *Mol. Plant. Pathol.* New York: IRL Press, 1992, pp. 23-29.
24. Debray H, Decout D, Strecker G, Spik G, Montreuil J. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *Eur. J. Biochem.* 1981; 117: 41-55.
25. Coles GC, Bauer C, Borgsteede FHM, Geerts S, Klei TR, Taylor MA, Waller PJ. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 1992; 44: 35-44.
26. Bahuaud D, Montellano CMO, Chauveau S, Prevot F, Torres-Acosta F, Fouraste I, et al. Effects of four tanniferous plant extracts on the in vitro exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitol.* 2006; 132: 545-554.
27. Jackson F, Hoste H. In vitro methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. - P.E. Vercoe, H.P.S. Makkar, A.C. Schlink (Eds.), *In Vitro Screening of Plant Resources for Extra-nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies*, FAO/International Atomic Energy Agency. Springer, Dordrecht, 2010; pp. 25–45.
28. Roditakis E, Roditake NE, Tsagkarakou A. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete. *Pest. Manag. Sci.* 2005; 61: 577-582.

29. Graphpad Software, Inc. 2007. Prism (data analysis software system), version 5. Disponível em: <<http://www.graphpad.com> >.
30. He M, Zhang K, Tan H, Hu R, Su J, Wang, et al. Nutrient levels within leaves, stems, and roots of the xeric species *Reaumuria soongorica* in relation to geographical, climatic, and soil conditions. *Ecol. Evol.* 2015; 5: 1494–1503.
31. Shih MC, Chang CM, Kang SM, Tsai ML. Effect of different parts (leaf, stem and stalk) and seasons (summer and winter) on the chemical compositions and antioxidant activity of *Moringa oleifera*. *Int. J. Mol. Sci.* 2011; 12: 6077-6088.
32. Benchabane M, Schlüter U, Vorster J, Goulet MC, Michaud D. Plant cystatins. *Biochimie.* 2010; 92: 1657-1666.
33. Liang L, Meng Z, Ye F, Yang J, Liu S, Sun Y, et al. The crystal structures of two cuticle-degrading proteases from nematophagous fungi and their contribution to infection against nematodes. *FASEB J.* 2010; 24: 1391-1400.
34. Junwei W, Qingling M, Jun Q, Weisheng W, Shuangqing C, Jianxun L, et al. The recombinant serine protease XAoz1 of *Arthrobotrys oligospora* exhibits potent nematicidal activity against *Caenorhabditis elegans* and *Haemonchus contortus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2013; 344: 53-59.
35. Mansfield LS, Gamble HR., Fetterer RH. Characterization of the egg shell of *Haemonchus contortus* - I. Structural components. *Comp. Biochem. Physiol B.* 1992; 103: 681-686.
36. Fetterer RH, Rhoads ML. Biochemistry of nematode cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. *Vet. Parasitol.* 1993; 46: 103-111.
37. Rogers WP. *The Nature of Parasitism*. New York, London: Academic Press. 1962.
38. Rogers WP. The role of leucine aminopeptidase in the moulting of nematode parasites. *Comp. Biochem. Physiol.* 1965; 14: 311-21.
39. Rogers WP. Exsheathment and hatching mechanisms in helminths. In *Biology of Parasites*. (ed. E. J. L. Soulsby), New York, London: Academic Press, 1966, pp. 33-40.
40. Moore B. Bifunctional and moonlighting enzymes: lighting the way to regulatory control. *Trends Plant. Sci.* 2004; 9: 221-218.
41. Rogers WP, Brooks F. The mechanism of hatching of eggs of *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 1977; 7: 61-65.

42. Sharma N, Sharma KP, Gaur RK, Grupta VK. Role of chitinase in plant defense. *Asian. J. Chem.* 2011; 6: 29-37.
43. Rocha RO, Morais JK, Oliveira JT, Oliveira HD, Sousa DO, Souza CE, et al. Proteome of Soybean Seed Exudates Contains Plant Defense-Related Proteins Active against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. *J. Agric. Food. Chem.* 2015; 63: 5335-5343.
44. Samalova M, Mélida H, Vilaplana F, Bulone V, Soanes DM, Talbot NJ, et al. The β -1,3-glucanosyltransferases (Gels) affect the structure of the rice blast fungal cell wall during appressorium-mediated plant infection. *Cell. Microbiol.* 2016; 19: 3.
45. Galiana E, Bonnet P, Conrod S, Keller H, Panabieres F, Ponchet M, et al. RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitor. *Plant. Physiol.* 1997; 115: 1557–1567.
46. Filipenko EA, Kochetov AV, Kanayama Y, Malinovsky VI, Shumny VK. PR-proteins with ribonuclease activity and plant resistance against pathogenic fungi. *Russ. J. Genet.* 2013; 3: 474–480.
47. Marban-Mendonza N, Jeyaprakash A, Janson HB, Damon-JR RA, Zuckerman BM. Control of root-knot nematodes on tomato by lectins. *J. Nematol.* 1987; 19: 331–335.
48. Marie-Magdeleine C, Mahieu M, D'Alexis S, Philibert L, Archimede H. In vitro effects of *Tabernaemontana citrifolia* extracts on *Haemonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.* 2010; 89: 88–92.
49. Soares AMS, Araújo SA, Lopes SG, Costa-Junior LM. Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* protein extracts on *Haemonchus contortus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2015; 24: 396-401.

Tabela 1. Atividade proteolítica (UA), atividade inibitória de protease (UI), atividade de quitinase (nKat) e atividade de lectina (UH) de frações proteicas obtidas de *Spigelia anthelmia*

Atividade proteica	Frações		
	LPF	SPF	RPF
Protease (UA)	569.13 ± 23.1	36.45 ± 0.9	219.42 ± 10.2
Inibitor de protease (UI)	111.31 ± 17.3	80.04 ± 6.0	117.21 ± 15.0
Quitinase (nkat)	0.01 ± 0.0	0.01 ± 0.0	0.07 ± 0.0
Lectina (UH)	-	-	-

LPF: fração proteica de folha; SPF: fração proteica de caule e RPF: fração proteica de raiz. Os valores estão em médias ± desvio padrão (DP) em triplicata. - indica que não foi detectado.

Tabela 2. Identificação das proteínas relacionadas com a defesa nas frações de *Spigelia anthelmia* por ESI-LC-MS/MS

Número de acesso	ID da Proteína	Descrição ^a	Peptídeos ^b	Massa média ^c	Cobertura (%) ^d
LPF					
gi 302180065	14330	Putative chitinase [<i>Catharanthus roseus</i>]	01	28.595	06
gi 4105131	8050	ClpC protease [<i>Spinacia oleracea</i>]	18	99.479	28
gi 514815760	14697	Probable serine protease EDA2-like [<i>Setaria italica</i>]	01	53.260	02
gi 355344587	16299	Cysteine protease [<i>Gossypium hirsutum</i>]	01	41.258	03
gi 15233518	15470	Aspartic proteinase A3 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	01	55.571	02
gi 573913588	15473	Aspartic proteinase oryzasin-1-like [<i>Oryza brachyantha</i>]	01	55.133	02
SPF					
gi 302180065	14330	Putative chitinase [<i>Catharanthus roseus</i>]	02	28.595	10
gi 374713649	45931	Cysteine protease [<i>Carica papaya</i>]	01	52.399	04
gi 568867401	45932	Cysteine proteinase RD21a-like [<i>Citrus sinensis</i>]	01	51.968	04
gi 357515189	35835	Aspartic proteinase nepenthesin-1 [<i>Medicago truncatula</i>]	02	46.803	05
gi 587875538	45560	26S protease regulatory subunit 7 [<i>Morus notabilis</i>]	02	47.725	05
gi 163311880	46481	Clp protease 2 proteolytic subunit [<i>Capsicum annuum</i>]	01	108.44	12
gi 148299083	46969	Subtilisin-like protease [<i>Nicotiana tabacum</i>]	01	81.188	01
gi 357507775	45024	Ribonuclease-like protein [<i>Medicago truncatula</i>]	01	17.783	12
gi 568846059	47634	L-type lectin-domain containing receptor kinase S.1-like [<i>Citrus sinensis</i>]	01	74.932	01
RPF					
gi 302180065	14330	Putative chitinase [<i>Catharanthus roseus</i>]	02	28.595	10
gi 355344587	16299	Cysteine proteases [<i>Gossypium hirsutum</i>]	01	41.258	03
gi 15233518	15470	Aspartic proteinase A3 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	01	55.571	02
gi 225428832	35020	subtilisin-like protease-like [<i>Vitis vinifera</i>]	01	82913	02
gi 565352903	34607	Probable serine protease EDA2-like isoform X2 [<i>Solanum tuberosum</i>]	01	53.985	02
gi 399240828	36301	Proteinase inhibitor [<i>Gossypium arboreum</i>]	01	7.536	17
gi 225460977	15676	Ribonuclease UK114-like [<i>Vitis vinifera</i>]	13	20.368	02

LPF: fração proteica de folha; SPF: fração proteica de caule e RPF: fração proteica de raiz. ^aTodas as proteínas foram identificadas nas frações de *S. anthelmia*; ^bPeptídeos identificados. ^cMassa média em kDa. ^dPercentagem (%) da sequência proteica representada pelos peptídeos identificados.

Tabela 3. Atividade anti-helmintica (EC_{50}) obtidas a partir da ação das frações proteicas de *Spigelia anthelmia* sobre ovos e larvas de *Haemonchus contortus*

Frações	EC_{50} mg mL ⁻¹ (CI 95%)		
	EHA	LEA	LMIA
LPF	0.17 (0.16-0.18) ^a	0.47 (0.37-0.59) ^a	0.21 (0.19-0.25) ^b
SPF	0.65 (0.60-0.70) ^b	> 1.20 ^c	0.14 (0.11-0.17) ^a
RPF	0.79 (0.74-0.84) ^c	0.78 (0.73-0.83) ^b	0.11 (0.08-0.14) ^a

LPF: fração proteica de folha; SPF: fração proteica de caule e RPF: fração proteica de raiz. EHA: Ensaio de eclosão de ovos; LEA: ensaio de desembainhamento larvar e LMIA: ensaio de inibição de migração larvar. EC_{50} = Concentração efetiva para 50% da população; IC 95% = intervalo de confiança de 95%. Letras sobrescrita diferentes representam diferenças significativas entre tratamentos ($P > 0.05$).

Material suplementar

Figura 1S: Lista de proteínas identificadas nas frações proteicas de *Spigelia anhelmia* por LC-ESI-MS. LPF: fração proteica de folha; SPF: fração proteica de caule e RPF: fração proteica de raiz

Lista de proteínas					
LPF		SPF		RPF	
Acesso	Descrição	Acesso	Descrição	Acesso	Descrição
gi 328920371	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Metopium brownei]	gi 113473614	methionine synthase [Orobanche ramosa]	gi 225455555	enolase [Vitis vinifera]
gi 22796798	ribulose-bisphosphate carboxylase [Ilex guianensis]	gi 255569484	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase, putative [Ricinus communis]	gi 527205924	fructose-bisphosphate aldolase [Genlisea aurea]
gi 567189798	hypothetical protein EUTSA_v10010325mg [Eutrema salsugineum]	gi 425194	heat shock protein [Spinacia oleracea]	gi 356569000	heat shock cognate 70 kDa protein 2-like [Glycine max]
gi 335059349	ATP synthase beta subunit, partial (chloroplast) [Spigelia humboldtiana]	gi 565365644	heat shock cognate 70 kDa protein 2-like [Solanum tuberosum]	gi 347361140	methionine synthase [Camellia sinensis]
gi 358249078	ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic-like [Glycine max]	gi 514753044	probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c-like [Setaria italica]	gi 404333012	HSP90 [Pelargonium peltatum]
gi 590563085	Rubisco activase isoform 2 [Theobroma cacao]	gi 147821107	hypothetical protein VITISV_018473 [Vitis vinifera]	gi 533474	2-phospho-D-glycerate hydrolase [Mesembryanthemum crystallinum]
gi 118489105	unknown [Populus trichocarpa x Populus deltoides]	gi 67845751	sucrose synthase [Coffea canephora]	gi 391324436	actin [Sophora viciifolia]
gi 527192911	hypothetical protein M569_11642, partial [Genlisea aurea]	gi 448872651	s-adenosylmethionine synthetase [Senecio scandens]	gi 565382232	V-type proton ATPase catalytic subunit A-like [Solanum tuberosum]
gi 335059341	ATP synthase beta subunit, partial (chloroplast) [Kopsia pauciflora]	gi 568856629	fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme-like [Citrus sinensis]	gi 460407874	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase-like [Solanum lycopersicum]
gi 432139325	fructose-bisphosphate aldolase 3 [Camellia oleifera]	gi 565382232	V-type proton ATPase catalytic subunit A-like [Solanum tuberosum]	gi 568215268	methionine synthase [Solanum tuberosum]
gi 566208506	ferredoxin-dependent glutamate synthase family protein [Populus trichocarpa]	gi 211573219	ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase [Kutchubaea semisericea]	gi 211906502	Isocitrate dehydrogenase [Gossypium hirsutum]
gi 356516495	chaperone protein ClpC, chloroplastic-like isoform X1 [Glycine max]gi 571460919 ref XP_006581844.1 PREDICTED: chaperone protein ClpC, chloroplastic-like isoform X2 [Glycine max]	gi 34597330	enolase [Brassica rapa subsp. oleifera]	gi 587863624	Elongation factor 2 [Morus notabilis]
gi 290750630	plastidic aldolase [Catharanthus roseus]	gi 527205924	fructose-bisphosphate aldolase [Genlisea aurea]	gi 460402090	monodehydroascorbate reductase-like [Solanum lycopersicum]
gi 354464671	fructose 1,6 bisphosphate aldolase class 1 [Carica papaya]	gi 350537129	vacuolar H+-ATPase A1 subunit isoform [Solanum lycopersicum]	gi 449452228	luminal-binding protein 5-like [Cucumis sativus]
gi 568863336	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA homolog CD4B, chloroplastic-like isoform X1 [Citrus sinensis]	gi 565369935	elongation factor 2-like [Solanum tuberosum]	gi 211906450	phosphoglycerate kinase [Gossypium hirsutum]
gi 4105131	ClpC protease [Spinacia oleracea]	gi 544186579	ATP synthase CF1 beta subunit [Eustegia minuta]	gi 309756515	pollen allergen MetE [Amaranthus retroflexus]
gi 255555933	phosphoribulose kinase, putative [Ricinus communis]	gi 260100692	molecular chaperone Hsp90-3 [Nicotiana benthamiana]	gi 514746569	malate dehydrogenase, mitochondrial-like [Setaria italica]
gi 255569484	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase, putative [Ricinus communis]	gi 288310312	HSP90-1 [Glycine max]	gi 15778152	14-3-3 protein [Nicotiana tabacum]
gi 1346155	Serine hydroxymethyltransferase 1, mitochondrial; Short=SHMT1; AltName: Full=Glycine hydroxymethyltransferase 1; AltName: Full=Serine methylase 1	gi 15076949	actin [Musa ABB Group]	gi 269994009	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase [Eucalyptus grandis x Eucalyptus urophylla]
gi 449444282	phosphoglycerate kinase, chloroplastic-like [Cucumis sativus]	gi 470136735	14-3-3-like protein-like [Fragaria vesca subsp. vesca]	gi 225425280	transaldolase isoform 1 [Vitis vinifera]
gi 347361140	methionine synthase [Camellia sinensis]	gi 145388968	alpha tubulin [Capsicum annuum]	gi 460404840	adenosylhomocysteinase-like isoform 2 [Solanum lycopersicum]

gi 224063766	transketolase family protein [Populus trichocarpa]	gi 395758594	phosphoenolpyruvate carboxylase [Manihot esculenta subsp. flabellifolia]	gi 556911902	calmodulin [Arachis hypogaea]
gi 590706395	Serine transhydroxymethyltransferase 1 isoform 2 [Theobroma cacao]	gi 325170120	ATP synthase beta subunit [Sapindus saponaria]	gi 255566397	aconitase, putative [Ricinus communis]
gi 359490179	transketolase, chloroplastic-like [Vitis vinifera]	gi 309756515	pollen allergen MeE [Amaranthus retroflexus]	gi 2160322	cytokinin binding protein CBP57 [Nicotiana glauca]
gi 356557028	phosphoglycerate kinase, chloroplastic [Glycine max]	gi 429326634	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase [Populus tomentosa]	gi 565361313	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic-like [Solanum tuberosum]
gi 18072799	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Capsicum annuum]	gi 2160322	cytokinin binding protein CBP57 [Nicotiana glauca]	gi 395758594	phosphoenolpyruvate carboxylase [Manihot esculenta subsp. flabellifolia]
gi 6683504	actin isoform B [Mimosa pudica]	gi 37051117	S-adenosylmethionine synthetase-2 [Pisum sativum]	gi 132449587	monodehydroascorbate reductase [Ipomoea batatas]
gi 587887488	Transketolase [Morus notabilis]	gi 359490179	transketolase, chloroplastic-like [Vitis vinifera]	gi 590621352	Proteasome subunit alpha type-5-A isoform 1 [Theobroma cacao]
gi 224088838	P-protein subunit of glycine decarboxylase enzyme complex [Populus trichocarpa]	gi 15865451	monodehydroascorbate reductase [Mesembryanthemum crystallinum]	gi 587884788	Serine hydroxymethyltransferase 1 [Morus notabilis]
gi 384372225	glutamate synthase [Beta vulgaris subsp. vulgaris]	gi 590723103	Transketolase [Theobroma cacao]	gi 565400366	triosephosphate isomerase, cytosolic-like [Solanum tuberosum]
gi 565382232	V-type proton ATPase catalytic subunit A-like [Solanum tuberosum]	gi 3738257	cytosolic phosphoglycerate kinase 1 [Populus nigra]	gi 587898318	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase [Morus notabilis]
gi 356564051	glycine dehydrogenase [decarboxylating], mitochondrial-like [Glycine max]	gi 29124969	3-phosphoglycerate kinase [Populus tremuloides]	gi 1743354	aldehyde dehydrogenase (NAD+) [Nicotiana tabacum]
gi 54043095	glycolate oxidase [Brassica napus]	gi 115371630	glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase [Knorringia sibirica]	gi 414881197	TPA: malate dehydrogenase [Zea mays]
gi 357469713	Transketolase [Medicago truncatula]	gi 587884788	Serine hydroxymethyltransferase 1 [Morus notabilis]	gi 89114124	sucrose synthase [Cichorium intybus]
gi 225810599	Sal k 3 pollen allergen [Salsola kali]	gi 527197626	elongation factor 1-alpha, partial [Genlisea aurea]	gi 21592905	mitochondrial NAD-dependent malate dehydrogenase [Arabidopsis thaliana]
gi 225456004	stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic-like [Vitis vinifera]	gi 2073448	glutamine synthetase [Lotus japonicus]	gi 590606725	Aconitase 3 [Theobroma cacao]
gi 590611713	Aldolase-type TIM barrel family protein isoform 1 [Theobroma cacao]	gi 527188518	14-3-3 h-1 protein [Genlisea aurea]	gi 6573119	phospholipase D alpha [Solanum lycopersicum]
gi 565369935	elongation factor 2-like [Solanum tuberosum]	gi 514773122	tubulin beta-5 chain-like [Setaria italica]	gi 568871177	ADP-ribosylation factor-like [Citrus sinensis]
gi 587877845	Glycine cleavage system P protein 1 [Morus notabilis]	gi 587914006	Malate dehydrogenase [Morus notabilis]	gi 473933356	Isocitrate dehydrogenase [NADP], chloroplastic [Triticum urartu]
gi 573913033	oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like [Oryza brachyantha]	gi 568879149	serine hydroxymethyltransferase 4-like [Citrus sinensis]	gi 193290660	putative ketol-acid reductoisomerase [Capsicum annuum]
gi 27804768	sedoheptulose-1,7-bisphosphatase precursor [Oryza sativa Indica Group]	gi 556911902	calmodulin [Arachis hypogaea]	gi 255548858	Iron(III)-zinc(II) purple acid phosphatase precursor, putative [Ricinus communis]
gi 255562058	malate dehydrogenase, putative [Ricinus communis]	gi 460388388	serine hydroxymethyltransferase 1-like [Solanum lycopersicum]	gi 284433792	nucleoside diphosphate kinase B [Jatropha curcas]
gi 3850621	putative RNA binding protein [Arabidopsis thaliana]	gi 356515770	14-3-3-like protein-like [Glycine max]	gi 565342662	tubulin alpha-3 chain-like isoform X2 [Solanum tuberosum]
gi 502122295	2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic-like [Cicer arietinum]	gi 573921273	luminal-binding protein 2-like [Oryza brachyantha]	gi 565402239	aconitase hydratase 2, mitochondrial-like [Solanum tuberosum]
gi 9230771	cytosolic phosphoglycerate kinase [Pisum sativum]	gi 568839402	endoplasmic reticulum chaperone [Citrus sinensis]	gi 413953664	restorer of fertility2 [Zea mays]
gi 583830761	cyclophilin [Camellia japonica]	gi 51949802	adenosine kinase isoform 2S [Nicotiana tabacum]	gi 14276718	T-cytoplasm male sterility restorer factor 2 [Zea mays]
gi 587868784	Heat shock 70 kDa protein 4 [Morus notabilis]	gi 357982	ATPase alpha,F1	gi 449437450	2-Cys peroxiredoxin BAS1-like, chloroplastic-like [Cucumis sativus]
gi 2623246	poly(A) polymerase [Pisum sativum]	gi 573954128	phosphoenolpyruvate carboxylase 2-like [Oryza brachyantha]	gi 587848615	Eukaryotic initiation factor 4A-15 [Morus notabilis]
gi 307136227	aminomethyltransferase [Cucumis melo subsp. melo]	gi 565375198	isocitrate dehydrogenase [NADP]-like [Solanum tuberosum]	gi 568839402	endoplasmic reticulum chaperone [Citrus sinensis]

gi 566170807	Chain A family protein [Populus trichocarpa]	gi 449526029	peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase GLO1-like [Cucumis sativus]	gi 347516612	Cr611 [Catharanthus roseus]
gi 15865451	monodehydroascorbate reductase [Mesembryanthemum crystallinum]	gi 568871177	ADP-ribosylation factor-like [Citrus sinensis]	gi 255552177	cysteine synthase, putative [Ricinus communis]
gi 565366189	serine-glyoxylate aminotransferase-like [Solanum tuberosum]	gi 565396854	phenylalanine ammonia-lyase-like [Solanum tuberosum]	gi 590644637	Calreticulin 1b isoform 1 [Theobroma cacao]
gi 194396261	plastid transketolase [Nicotiana tabacum]	gi 351735538	3-phosphoglycerate kinase, partial [Agropyron cristatum]	gi 573951684	peroxidase 70-like [Oryza brachyantha]
gi 357437449	Glycine dehydrogenase P protein [Medicago truncatula]	gi 565358263	UDP-glucuronic acid decarboxylase 6-like isoform X1 [Solanum tuberosum]	gi 356543900	ketol-acid reductoisomerase, chloroplastic-like [Glycine max]
gi 587887772	Chaperone protein ClpC [Morus notabilis]	gi 590594358	Chaperone protein htpG family protein isoform 2 [Theobroma cacao]	gi 32481059	transaldolase [Solanum lycopersicum]
gi 154254841	putative chloroplast glyceradehyde-3-phosphate dehydrogenase subunit B [Olea europaea]	gi 587929027	Phenylalanine ammonia-lyase [Morus notabilis]	gi 255538970	endoplasmic, putative [Ricinus communis]
gi 126894	Malate dehydrogenase, glyoxysomal; Flags: Precursor [Citrullus lanatus subsp. vulgaris]	gi 356558908	NADP-dependent malic enzyme-like [Glycine max]	gi 545693910	leucine aminopeptidase [Nicotiana tabacum]
gi 56122688	chloroplast latex aldolase-like protein [Manihot esculenta]	gi 356575355	calreticulin [Glycine max]	gi 573951585	superoxide dismutase [Cu-Zn] 2-like [Oryza brachyantha]
gi 350536649	superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplastic [Solanum lycopersicum]	gi 587908764	Oxygen-evolving enhancer protein 1 [Morus notabilis]	gi 583830761	cyclophilin [Camellia japonica]
gi 11558242	peroxiredoxin [Phaseolus vulgaris]	gi 565386264	malate dehydrogenase, mitochondrial-like [Solanum tuberosum]	gi 548578438	mitochondrial gamma aminobutyrate transaminase 1 [Nicotiana tabacum]
gi 366984862	alanine glyoxylate aminotransferase [Peperomia putlaensis]	gi 565400366	triosephosphate isomerase, cytosolic-like [Solanum tuberosum]	gi 33329198	putative fructokinase 2 [Petunia integrifolia subsp. inflata]
gi 590644896	Chloroplast RNA binding [Theobroma cacao]	gi 344323570	S-adenosylmethionine synthetase [Helianthus annuus]	gi 6048277	pectin methylesterase [Nicotiana tabacum]
gi 460408278	enolase-like [Solanum lycopersicum]	gi 568823913	serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial-like [Citrus sinensis]	gi 502095327	glucose-6-phosphate isomerase 1, chloroplastic-like isoform X2 [Cicer arietinum]
gi 587863593	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase [Morus notabilis]	gi 170293987	ATP synthase beta subunit [Micromonas sp. SYD]	gi 587949093	Aconitate hydratase 1 [Morus notabilis]
gi 349585020	chloroplast phosphoribulokinase [Chara braunii]	gi 568856499	monodehydroascorbate reductase, seedling isozyme-like [Citrus sinensis]	gi 502118058	chaperonin CPN60-2, mitochondrial-like [Cicer arietinum]
gi 255581842	hydroxypyruvate reductase, putative [Ricinus communis]	gi 514815422	alpha-1,4-glucan-protein synthase [UDP-forming]-like [Setaria italica]	gi 302180065	putative chitinase [Catharanthus roseus]
gi 514735237	tubulin alpha-3 chain-like [Setaria italica]	gi 565371593	isocitrate dehydrogenase [NADP]-like [Solanum tuberosum]	gi 587867341	Phosphoglycerate kinase [Morus notabilis]
gi 322517783	molecular chaperone Hsp90 [Nicotiana tabacum]	gi 403241995	UDP-glucose pyrophosphorylase [Elaeagnus umbellata]	gi 587918941	Chaperone protein [Morus notabilis]
gi 592874629	ADP-glucose pyrophosphorylase small-subunit [Vitis labrusca x Vitis vinifera]	gi 356543708	aconitate hydratase 2, mitochondrial-like [Glycine max]	gi 1122288	aspartate aminotransferase [Lotus japonicus]
gi 118500769	putative ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit [Sorghum bicolor]	gi 583830761	cyclophilin [Camellia japonica]	gi 502144355	gamma aminobutyrate transaminase 1, mitochondrial-like [Cicer arietinum]
gi 565390398	adenosylhomocysteinase-like isoform X1 [Solanum tuberosum]	gi 11558242	peroxiredoxin [Phaseolus vulgaris]	gi 75756240	calmodulin 1 [Catharanthus roseus]
gi 408777705	catalase, partial [Populus tomentosa]	gi 568836306	calreticulin-like [Citrus sinensis]	gi 225433414	probable voltage-gated potassium channel subunit beta [Vitis vinifera]
gi 590701975	Catalase 2 [Theobroma cacao]	gi 148872938	ATP citrate lyase alpha subunit [Glycyrrhiza uralensis]	gi 502126373	endoplasmic homolog isoform X3 [Cicer arietinum]
gi 470143913	sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplastic-like [Fragaria vesca subsp. vesca]	gi 167613943	O-methyltransferase 5 [Humulus lupulus]	gi 21553673	transketolase-like protein [Arabidopsis thaliana]
gi 5668671	Beta-tubulin [Zinnia elegans]	gi 590713444	40S ribosomal protein S8 isoform 3 [Theobroma cacao]	gi 15235226	GTP-binding protein SAR1A [Arabidopsis thaliana]
gi 71834884	Rubisco activase 2 [Mesembryanthemum crystallinum]	gi 255543230	Transaldolase, putative [Ricinus communis]gi 223548639[gb]EEF50130.1	gi 565374533	Transaldolase, putative [Solanum tuberosum]

		[<i>Ricinus communis</i>]	
gi 449442569	serine--glyoxylate aminotransferase-like [<i>Cucumis sativus</i>]	gi 356516569	proteasome subunit beta type-5-like [<i>Glycine max</i>]
gi 587929411	Glycerate dehydrogenase [<i>Morus notabilis</i>]	gi 228455	Gln synthetase
gi 590574979	Thioredoxin superfamily protein, Q [<i>Theobroma cacao</i>]	gi 134685	Superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplastic [<i>Pinus sylvestris</i>]
gi 514718113	40S ribosomal protein S8-like [<i>Setaria italica</i>]	gi 88193697	phospholipase D alpha 2 [<i>Arachis hypogaea</i>] gi 88193701 dbj BAE79737.1 phospholipase D alpha 2 [<i>Arachis hypogaea</i>]
gi 557923441	ATPase subunit 1 (mitochondrion) [<i>Asclepias syriaca</i>]	gi 565366863	leucine aminopeptidase 2, chloroplastic-like [<i>Solanum tuberosum</i>]
gi 530704722	O-acetylserine thiol-lyase [<i>Nicotiana attenuata</i>]	gi 32481059	transaldolase [<i>Solanum lycopersicum</i>]
gi 490263019	alanine-glyoxylate aminotransferase, partial [<i>Manekia incurva</i>]	gi 449437450	2-Cys peroxiredoxin BAS1-like, chloroplastic-like [<i>Cucumis sativus</i>]
gi 449452228	luminal-binding protein 5-like [<i>Cucumis sativus</i>]	gi 502147919	phospholipase D alpha 1-like [<i>Cicer arietinum</i>]
gi 146741370	glutamine synthetase [<i>Avicennia marina</i>]	gi 307136311	multicopper oxidase [<i>Cucumis melo</i> subsp. <i>melo</i>]
gi 514714276	ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme, chloroplastic-like isoform X2 [<i>Setaria italica</i>]	gi 449455707	L-ascorbate oxidase homolog [<i>Cucumis sativus</i>]
gi 281485512	aldolase C-2 [<i>Phyllostachys edulis</i>]	gi 3893824	ATPase beta subunit [<i>Nicotiana sylvestris</i>]
gi 514798222	14-3-3-like protein GF14-C-like isoform X3 [<i>Setaria italica</i>]	gi 336390	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase B subunit [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
gi 571331016	actin, partial [<i>Cucurbita moschata</i>]	gi 566197059	aconitate hydratase family protein [<i>Populus trichocarpa</i>] gi 550326497 gb ERP54576.1 aconitate hydratase family protein [<i>Populus trichocarpa</i>]
gi 356543900	ketol-acid reductoisomerase, chloroplastic-like [<i>Glycine max</i>]	gi 502103359	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH], chloroplastic-like [<i>Cicer arietinum</i>]
gi 20502881	carbonic anhydrase [<i>Gossypium hirsutum</i>]	gi 590631824	Monodehydroascorbate reductase, seedling isozyme [<i>Theobroma cacao</i>]
gi 357520877	Malic enzyme [<i>Medicago truncatula</i>]	gi 590645361	Cytosolic NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase isoform 1 [<i>Theobroma cacao</i>]
gi 510948554	glyoxylate aminotransferase, partial [<i>Silene vulgaris</i>]	gi 356513167	NADP-dependent malic enzyme-like isoform X1 [<i>Glycine max</i>]
gi 584481456	glutathione reductase cytosolic-like protein [<i>Camellia sinensis</i>]	gi 449432454	probable voltage-gated potassium channel subunit beta-like [<i>Cucumis sativus</i>]
gi 571532333	aspartate aminotransferase isoform X1 [<i>Glycine max</i>]	gi 313585342	eukaryotic translation elongation factor 1B gamma-subunit [<i>Hevea brasiliensis</i>]
gi 543177291	cysteine synthase [<i>Phaseolus vulgaris</i>]	gi 460391525	lysosomal beta glucosidase-like [<i>Solanum lycopersicum</i>]
gi 284433792	nucleoside diphosphate kinase B [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 432139323	fructose-bisphosphate aldolase 2 [<i>Camellia oleifera</i>]
gi 502143864	phosphoenolpyruvate carboxylase-like [<i>Cicer arietinum</i>]	gi 590667992	Malate dehydrogenase [<i>Theobroma cacao</i>]
gi 590717461	Chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa isoform 1 [<i>Theobroma cacao</i>]	gi 568867439	caffeoyl-CoA O-methyltransferase-like [<i>Citrus sinensis</i>]
gi 30698124	14-3-3-like protein GF14 kappa [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	gi 590719106	Ribosomal protein S4 (RPS4A) family protein [<i>Theobroma cacao</i>]
gi 460415178	dihydropyridyl dehydrogenase, mitochondrial-like isoform 2 [<i>Solanum lycopersicum</i>]	gi 357483921	Aconitate hydratase [<i>Medicago truncatula</i>]
gi 590630738	Adenosine kinase 2 [<i>Theobroma cacao</i>]	gi 228412	malic enzyme
gi 460407644	villin-2-like [<i>Solanum lycopersicum</i>]	gi 154146764	phosphoenolpyruvate carboxylase [<i>Isachne mauritiana</i>]
gi 21553775	citrate synthase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	gi 587943990	Triosephosphate isomerase [<i>Morus notabilis</i>]
gi 19620	isoflavone reductase [<i>Medicago sativa</i>]	gi 22217761	histone H4 [<i>Daucus carota</i>]
gi 400234898	poly-A binding protein, partial [<i>Nicotiana benthamiana</i>]	gi 502146267	patellin-2-like [<i>Cicer arietinum</i>]
gi 449433964	putative lactoylglutathione lyase-like [<i>Cucumis sativus</i>]	gi 460394159	xylose isomerase-like [<i>Solanum lycopersicum</i>]
gi 124488474	benzoquinone reductase [<i>Gossypium hirsutum</i>]	gi 543176450	glutamine synthetase [<i>Phaseolus vulgaris</i>]
gi 359475515	LL-diaminopimelate aminotransferase, chloroplastic-like [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 341865452	quinone reductase [<i>Nicotiana benthamiana</i>]
gi 587899824	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 56 [<i>Morus notabilis</i>]	gi 527191543	pectinesterase [<i>Genlisea aurea</i>]
gi 565386706	citrate synthase, mitochondrial-like [<i>Solanum tuberosum</i>]	gi 85700174	glucose-6-phosphate dehydrogenase [<i>Populus trichocarpa</i>]
gi 300249659	PAA1 [<i>Carica papaya</i>]	gi 604322	sporamin [<i>Ipomoea batatas</i>]
gi 545722089	Cu/Zn superoxide dismutase [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 590659719	Cyanate hydratase [<i>Theobroma cacao</i>]
gi 21592931	phosphoserine aminotransferase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	gi 9929159	manganese superoxide dismutase [<i>Digitalis lanata</i>]
gi 565394728	endoplasmic homolog [<i>Solanum tuberosum</i>]	gi 530704722	O-acetylserine thiol-lyase [<i>Nicotiana attenuata</i>]

gi 473993048	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase [Triticum urartu]	gi 413942444	putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein [Zea mays]	gi 15242492	beta-xylosidase 3 [Arabidopsis thaliana]
gi 413953664	restorer of fertility2 [Zea mays]	gi 73647621	aldehyde dehydrogenase [Vitis pseudoreticulata]	gi 300433289	annexin 1 [Brassica napus]
gi 15241945	GDP-mannose 3,5-epimerase [Arabidopsis thaliana]	gi 171854675	putative aconitase [Capsicum chinense]	gi 357483671	Thymus-specific serine protease [Medicago truncatula]
gi 449470277	glycine--tRNA ligase 1, mitochondrial-like [Cucumis sativus]	gi 255576667	methylenetetrahydrofolate reductase, putative [Ricinus communis]gi 223531341 gb EEF33179.1 methylenetetrahydrofolate reductase, putative [Ricinus communis]	gi 587949055	Phosphoserine aminotransferase [Morus notabilis]
gi 587849016	Triosephosphate isomerase [Morus notabilis]	gi 589735558	6-phosphogluconate dehydrogenase [Hibiscus cannabinus]	gi 55700947	TPA: class III peroxidase 40 precursor [Oryza sativa Japonica Group]
gi 259661806	NADP-dependent malic enzyme [Melinis minutiflora]	gi 356508933	L-ascorbate oxidase homolog [Glycine max]	gi 587946914	Selenium-binding protein 2 [Morus notabilis]
gi 568839326	ATP sulfurylase 2-like [Citrus sinensis]	gi 587849016	Triosephosphate isomerase [Morus notabilis]	gi 558695697	alpha-galactosidase-like protein [Phaseolus vulgaris]
gi 565375198	isocitrate dehydrogenase [NADP]-like [Solanum tuberosum]	gi 342722663	methylenetetrahydrofolate reductase [Nicotiana tomentosiformis]	gi 58200403	isochorismate synthase [Capsicum annum]
gi 587894064	Quinone oxidoreductase-like protein [Morus notabilis]	gi 356534530	2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic [Glycine max]	gi 3582436	beta-D-glucan exohydrolase [Nicotiana tabacum]
gi 565374533	guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein-like [Solanum tuberosum]	gi 3201554	beta-D-glucosidase [Tropaeolum majus]	gi 587864838	Hsc70-interacting protein [Morus notabilis]
gi 255543230	Transaldolase, putative [Ricinus communis]	gi 565355585	mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37a-like [Solanum tuberosum]	gi 356563248	FAM10 family protein At4g22670-like [Glycine max]
gi 486174164	rpS18A, partial [Ceratodon purpureus]	gi 356564051	glycine dehydrogenase [decarboxylating], mitochondrial-like [Glycine max]	gi 571484736	bilirubin oxidase-like [Glycine max]
gi 550848736	dehydroascorbate reductase [Cicer arietinum]	gi 568827169	minor allergen Alt a 7-like [Citrus sinensis]	gi 356535723	laccase-15-like [Glycine max]
gi 502137590	glutathione S-transferase DHAR3, chloroplastic-like [Cicer arietinum]	gi 15239652	flavodoxin-like quinone reductase 1 [Arabidopsis thaliana]	gi 225460977	ribonuclease UK114-like [Vitis vinifera]
gi 42573724	lactate/malate dehydrogenase family protein [Arabidopsis thaliana]	gi 565382972	ATP synthase subunit beta, mitochondrial-like [Solanum tuberosum]	gi 356575371	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial-like [Glycine max]
gi 568840082	leucine aminopeptidase 3, chloroplastic-like [Citrus sinensis]	gi 449470277	glycine--tRNA ligase 1, mitochondrial-like [Cucumis sativus]	gi 289546505	ferritin 1 [Lupinus luteus]
gi 532166932	UDP-glucose pyrophosphorylase [Ipomoea trifida]	gi 587889431	Ketol-acid reductoisomerase [Morus notabilis]	gi 568838761	dipeptidyl-peptidase 5-like [Citrus sinensis]
gi 587945786	Phosphoglucomutase [Morus notabilis]	gi 514802221	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6-like [Setaria italica]	gi 587905041	GDP-mannose 3,5-epimerase 1 [Morus notabilis]
gi 502121732	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP20-2, chloroplastic-like [Cicer arietinum]	gi 11066033	cytosolic aconitase [Nicotiana tabacum]	gi 355344587	cysteine proteases [Gossypium hirsutum]
gi 23978579	fructokinase [Nicotiana tabacum]	gi 502076733	stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic-like [Cicer arietinum]	gi 15233518	aspartic proteinase A3 [Arabidopsis thaliana]
gi 452114380	glutathione reductase [Vitis vinifera]	gi 460404180	cysteine synthase-like [Solanum lycopersicum]	gi 326467055	succinate dehydrogenase [Litchi chinensis]
gi 474292820	60S ribosomal protein L11 [Triticum urartu]	gi 225441977	pectinesterase 3-like [Vitis vinifera]	gi 525338012	12-oxo-phytodienoic acid reductase [Catharanthus roseus]
gi 514759289	plastocyanin, chloroplastic-like [Setaria italica]	gi 255576721	triosephosphate isomerase, putative [Ricinus communis]	gi 573919224	T-complex protein 1 subunit delta-like [Oryza brachyantha]
gi 449432858	translationally-controlled tumor protein homolog [Cucumis sativus]	gi 502148965	fructokinase-2-like [Cicer arietinum]	gi 24421231	ascorbate peroxidase [Brassica juncea]
gi 568838496	patellin-2-like [Citrus sinensis]	gi 560939367	arginyl-tRNA synthetase-like protein [Camellia sinensis]	gi 154721452	thioredoxin [Limonium bicolor]
gi 502145557	superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplastic-like [Cicer arietinum]	gi 590662987	Betaine aldehyde dehydrogenase 1 [Theobroma cacao]gi 508773329 gb EOY20585.1 Betaine aldehyde dehydrogenase 1 [Theobroma cacao]	gi 490262723	carboxymethylenebutenolidase, partial [Xymalos monospora]
gi 357479373	20 kDa chaperonin [Medicago truncatula]	gi 225445206	aspartate aminotransferase, cytoplasmic [Vitis vinifera]	gi 306009673	FK506 binding-like protein [Picea sitchensis]
gi 356551074	chaperone protein ClpB3, chloroplastic [Glycine max]	gi 380853844	acetyl-CoA carboxylase [Nicotiana tabacum]	gi 255567666	endo-1,3-1,4-beta-d-glucanase, putative [Ricinus communis]

gi 475559072	Elongation factor G, chloroplastic [Aegilops tauschii]	gi 573925427	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 2-like [Oryza brachyantha]	gi 565352903	probable serine protease EDA2-like isoform X2 [Solanum tuberosum]
gi 502142838	magnesium-chelatase subunit ChII, chloroplastic-like isoform X3 [Cicer arietinum]	gi 502175770	monocopper oxidase-like protein SKU5-like [Cicer arietinum]	gi 225465847	NADPH:quinone oxidoreductase [Vitis vinifera]
gi 356496602	aconitate hydratase 1 [Glycine max]	gi 2829893	phosphoglucomutase [Arabidopsis thaliana]	gi 502081910	triosephosphate isomerase, cytosolic-like [Cicer arietinum]
gi 225451695	monothiol glutaredoxin-S14, chloroplastic-like [Vitis vinifera]	gi 359494603	phosphoglycerate kinase, chloroplastic [Vitis vinifera]	gi 6002104	Acyl-CoA binding protein (ACBP) [Digitalis lanata]
gi 302180065	putative chitinase [Catharanthus roseus]	gi 42733490	BR11-KD interacting protein 114 [Oryza sativa Japonica Group]	gi 590577508	ATP-dependent caseinolytic (Clp) protease/crotonase family protein isoform 2 [Theobroma cacao]
gi 502144695	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH], chloroplastic-like [Cicer arietinum]	gi 502136647	caffeic acid 3-O-methyltransferase-like [Cicer arietinum]	gi 304557199	protein disulfide isomerase [Citrus limon]
gi 590583217	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein isoform 3 [Theobroma cacao]	gi 334187022	villin 4 [Arabidopsis thaliana]	gi 258644638	cyclase-like protein [Oryza sativa Indica Group]
gi 449459988	coproporphyrinogen-III oxidase, chloroplastic-like [Cucumis sativus]	gi 374713649	cysteine protease [Carica papaya]	gi 399240828	proteinase inhibitor [Gossypium arboreum]
gi 587847372	1,4-alpha-glucan-branching enzyme 2-2 [Morus notabilis]	gi 568867401	cysteine proteinase RD21a-like [Citrus sinensis]	gi 225428832	subtilisin-like protease-like [Vitis vinifera]
gi 21327029	glutamate decarboxylase [Nicotiana tabacum]	gi 568836518	adenine phosphoribosyltransferase 1, chloroplastic-like [Citrus sinensis]	gi 469517894	cyclophilin, partial [Atropa belladonna]
gi 565399766	lysosomal alpha-mannosidase-like [Solanum tuberosum]	gi 341865452	quinone reductase [Nicotiana benthamiana]	gi 45735396	basal body protein [Chlamydomonas reinhardtii]
gi 28972463	glutamate 1-semialdehyde aminotransferase [Brassica napus]	gi 154146886	phosphoenolpyruvate carboxylase [Setaria palmifolia]	gi 226500726	hydroxyacid oxidase 1 [Zea mays]
gi 565403781	triosephosphate isomerase, chloroplastic-like [Solanum tuberosum]	gi 590601018	Peroxidase [Theobroma cacao]	gi 77999255	unknown [Solanum tuberosum]
gi 390985896	glutathione peroxidase [Vitis pseudoreticulata]	gi 186200783	ascorbate peroxidase [Capsicum chinense]	gi 388495758	unknown [Medicago truncatula]
gi 2323344	alpha-glucosidase 1 [Arabidopsis thaliana]	gi 55701089	class III peroxidase 111 precursor [Oryza sativa Japonica Group]	gi 148910696	unknown [Picea sitchensis]
gi 11692884	AT4g28750 [Arabidopsis thaliana]	gi 527189531	protein disulfide-isomerase, partial [Genlisea aurea]	gi 388515465	unknown [Lotus japonicus]
gi 158427468	chloroplast thioredoxin f [Fragaria x ananassa]	gi 502083283	aconitate hydratase 2, mitochondrial-like [Cicer arietinum]	gi 118481133	unknown [Populus trichocarpa]
gi 590659719	Cyanate hydratase [Theobroma cacao]	gi 587948902	putative xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein B [Morus notabilis]		
gi 378532211	copper/zinc superoxide dismutase [Musa acuminata]	gi 587847386	Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme [Morus notabilis]		
gi 7649161	cyclophilin [Euphorbia esula]	gi 570709913	fructokinase [Camellia sinensis]		
gi 449464030	porphobilinogen deaminase, chloroplastic-like [Cucumis sativus]	gi 565362787	lactoylglutathione lyase-like isoform X1 [Solanum tuberosum]		
gi 449461691	alanine--tRNA ligase-like [Cucumis sativus]	gi 452114380	glutathione reductase [Vitis vinifera]		
gi 225441977	pectinesterase 3-like [Vitis vinifera]	gi 565350287	L-ascorbate oxidase homolog [Solanum tuberosum]		
gi 154721452	thioredoxin [Limonium bicolor]	gi 565400707	glutamate decarboxylase-like [Solanum tuberosum]		
gi 590584288	Glycosyl hydrolase superfamily protein, putative [Theobroma cacao]	gi 477541651	GDP-mannose-3',5'-epimerase [Camellia sinensis]		
gi 21038869	putative stachyose synthase [Alonsoa meridionalis]	gi 9929159	manganese superoxide dismutase [Digitalis lanata]		
gi 587905325	Formate--tetrahydrofolate ligase [Morus notabilis]	gi 514785633	calreticulin-3-like [Setaria italica]		
gi 565402239	aconitate hydratase 2, mitochondrial-like [Solanum tuberosum]	gi 460373807	lactoylglutathione lyase-like [Solanum lycopersicum]		

gi 460366318	30S ribosomal protein S1, chloroplastic-like [Solanum lycopersicum]	gi 514774273	isoflavone reductase homolog IRL-like [Setaria italica]
gi 587839629	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A [Morus notabilis]	gi 7573308	isocitrate dehydrogenase-like protein [Arabidopsis thaliana]
gi 590567193	Amidase family protein isoform 1 [Theobroma cacao]	gi 590627525	Guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor 1 isoform 1 [Theobroma cacao]
gi 149207273	fructose-1,6-bisphosphatase [Flaveria linearis]	gi 460404765	glutathione reductase, cytosolic isoform 1 [Solanum lycopersicum]
gi 514720557	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 34-like [Setaria italica]	gi 356497769	carbonic anhydrase, chloroplastic-like isoformX2 [Glycine max]
gi 590647298	Sulfite oxidase [Theobroma cacao]	gi 568866638	L-ascorbate oxidase homolog [Citrus sinensis]
gi 9759324	GcpE protein [Arabidopsis thaliana]	gi 7548843	aspartate aminotransferase isozyme 5 [Glycine max]
gi 9929159	manganese superoxide dismutase [Digitalis lanata]	gi 449520445	glucose-6-phosphate isomerase 1, chloroplastic-like [Cucumis sativus]
gi 573932473	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase-like [Oryza brachyantha]	gi 568871374	GTP-binding protein SAR1A-like [Citrus sinensis]
gi 2429286	peroxidase [Oryza sativa Indica Group]	gi 405780100	gamma-aminobutyrate transaminase 2 [Malus domestica]
gi 10880493	fasciclin-like arabinogalactan protein FLA8 [Arabidopsis thaliana]	gi 1556429	citrate synthase [Nicotiana tabacum]
gi 470137658	acetate--CoA ligase ACS, chloroplastic/glyoxysomal-like [Fragaria vesca subsp. vesca]	gi 13785471	phosphoenolpyruvate carboxykinase [Flaveria pringlei]
gi 162458350	glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 2, chloroplastic/amyloplastic [Zea mays]	gi 3582436	beta-D-glucan exohydrolase [Nicotiana tabacum]
gi 449478569	quinone oxidoreductase-like protein At1g23740, chloroplastic-like [Cucumis sativus]	gi 587875538	26S protease regulatory subunit 7 [Morus notabilis]
gi 255567666	endo-1,3-1,4-beta-d-glucanase, putative [Ricinus communis]	gi 224482639	pectinesterase [Annona cherimola]
gi 587930154	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase [Morus notabilis]	gi 527202319	triosephosphate isomerase [Genlisea aurea]
gi 217795376	transaldolase [Dimocarpus longan]	gi 1199967	histone H4 [Allium cepa]
gi 15233518	aspartic proteinase A3 [Arabidopsis thaliana]	gi 223593	carboxylase/oxygenase,RBP
gi 573913588	aspartic proteinase oryzasin-1-like [Oryza brachyantha]	gi 468861715	malic enzyme [Stylosanthes guianensis]
gi 425872922	purple acid phosphatase [Citrus trifoliata]	gi 565399766	lysosomal alpha-mannosidase-like [Solanum tuberosum]
gi 568838403	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial-like [Citrus sinensis]	gi 449532121	gamma aminobutyrate transaminase 1, mitochondrial-like, partial [Cucumis sativus]
gi 190897024	NADH:flavin oxidoreductase [Populus tremula]	gi 527206494	alpha-mannosidase, partial [Genlisea aurea]
gi 315937254	12-oxophytodienoate reductase [Jatropha curcas]	gi 573953901	UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase 1-like [Oryza brachyantha]
gi 460367516	thylakoid lumenal 19 kDa protein, chloroplastic-like [Solanum lycopersicum]	gi 325464691	adenylyl cyclase associated protein [Gossypium raimondii]
gi 514815760	probable serine protease EDA2-like [Setaria italica]	gi 357515189	Aspartic proteinase nepenthesin-1 [Medicago truncatula]
gi 6273331	glycine-rich RNA binding protein, partial [Medicago sativa]	gi 6002102	Acyl-CoA binding protein (ACBP) [Digitalis lanata]
gi 514713083	2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic-like [Setaria italica]	gi 302180065	putative chitinase [Catharanthus roseus]

gi 356520639	beta-glucosidase 44-like [Glycine max]	gi 565380061	serine--tRNA ligase-like [Solanum tuberosum]
gi 20009	ribonucleoprotein [Nicotiana tabacum]	gi 587907742	Fumarate hydratase 1 [Morus notabilis]
gi 565396585	protein disulfide-isomerase-like [Solanum tuberosum]	gi 573913187	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 15-like [Oryza brachyantha]
gi 543176450	glutamine synthetase [Phaseolus vulgaris]	gi 568828698	alpha-galactosidase-like [Citrus sinensis]
gi 587892142	Cysteine--tRNA ligase [Morus notabilis]	gi 324330343	cinnamyl alcohol dehydrogenase [Acacia mangium]
gi 578002909	ribosomal protein L2 (chloroplast) [Chenopodium quinoa]	gi 163311880	Clp protease 2 proteolytic subunit [Capsicum annuum]
gi 355344587	cysteine proteases [Gossypium hirsutum]	gi 565385933	probable aldo-keto reductase 4-like isoform X2 [Solanum tuberosum]
gi 188011481	beta-1,3-glucanase [Vitis riparia]	gi 502152086	aldose 1-epimerase-like isoform X1 [Cicer arietinum]
gi 357966948	heme oxygenase-3 [Brassica juncea]	gi 571484736	bilirubin oxidase-like [Glycine max]
gi 587891634	Sucrose synthase 2 [Morus notabilis]	gi 571454345	carbonic anhydrase, chloroplastic isoform X3 [Glycine max]
gi 118489105	unknown [Populus trichocarpa x Populus deltoides]	gi 300433289	annexin 1 [Brassica napus]
gi 255641007	unknown [Glycine max]	gi 514805541	ferritin-1, chloroplastic-like [Setaria italica]
gi 217072476	unknown [Medicago truncatula]	gi 587922295	Serine/threonine-protein kinase SAPK2 [Morus notabilis]
gi 116786949	unknown [Picea sitchensis]	gi 148299083	subtilisin-like protease [Nicotiana tabacum]
gi 388514195	unknown [Lotus japonicus]	gi 460412297	fasciclin-like arabinogalactan protein 2-like [Solanum lycopersicum]
		gi 307563162	isochorismate synthase [Rubia cordifolia]
		gi 565356492	isoaspartyl peptidase/L-asparaginase-like [Solanum tuberosum]
		gi 350535356	aspartic protease precursor [Solanum lycopersicum]
		gi 27652186	carbonic anhydrase 3 [Flaveria bidentis]
		gi 10799202	glycine-rich RNA-binding protein [Sorghum bicolor]
		gi 475625374	Beta-D-xylosidase 4 [Aegilops tauschii]
		gi 413919687	putative O-Glycosyl hydrolase superfamily protein [Zea mays]
		gi 356547931	12-oxophytodienoate reductase 3 [Glycine max]
		gi 190897024	NADH:flavin oxidoreductase [Populus tremula]
		gi 357495501	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic [Medicago truncatula]
		gi 330417990	acetoacetyl-CoA thiolase [Catharanthus roseus]
		gi 587838261	Beta-glucosidase 12 [Morus notabilis]
		gi 587849068	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 10 [Morus notabilis]
		gi 571449582	glucan endo-1,3-beta-glucosidase 5-like [Glycine max]
		gi 590619398	Casein kinase I protein isoform 3 [Theobroma cacao]
		gi 527195911	chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, partial [Genlisea aurea]
		gi 470149123	nuclear transport factor 2-like [Fragaria vesca subsp. vesca]
		gi 544636780	patellin-5, partial [Avicennia marina var. marina]
		gi 470101219	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase-like protein 3, mitochondrial-like isoform 1 [Fragaria vesca subsp. vesca]
		gi 373839258	peroxiredoxin Q [Haloxylon ammodendron]

gi 432152297	60S ribosomal protein L10a, partial [Coccomyxa pringsheimii]
gi 225423730	glycine cleavage system H protein, mitochondrial [Vitis vinifera]
gi 308803224	putative NADH dehydrogenase (ISS) [Ostreococcus tauri]
gi 449432265	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase 1, chloroplastic-like [Cucumis sativus]
gi 568846059	L-type lectin-domain containing receptor kinase S.1-like [Citrus sinensis]
gi 514725203	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1B-like [Setaria italica]
gi 514752444	chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa b, chloroplastic-like [Setaria italica]
gi 148910696	unknown [Picea sitchensis]
gi 118481158	unknown [Populus trichocarpa]
gi 28058762	Unknown protein [Arabidopsis thaliana]
gi 255637631	unknown [Glycine max]

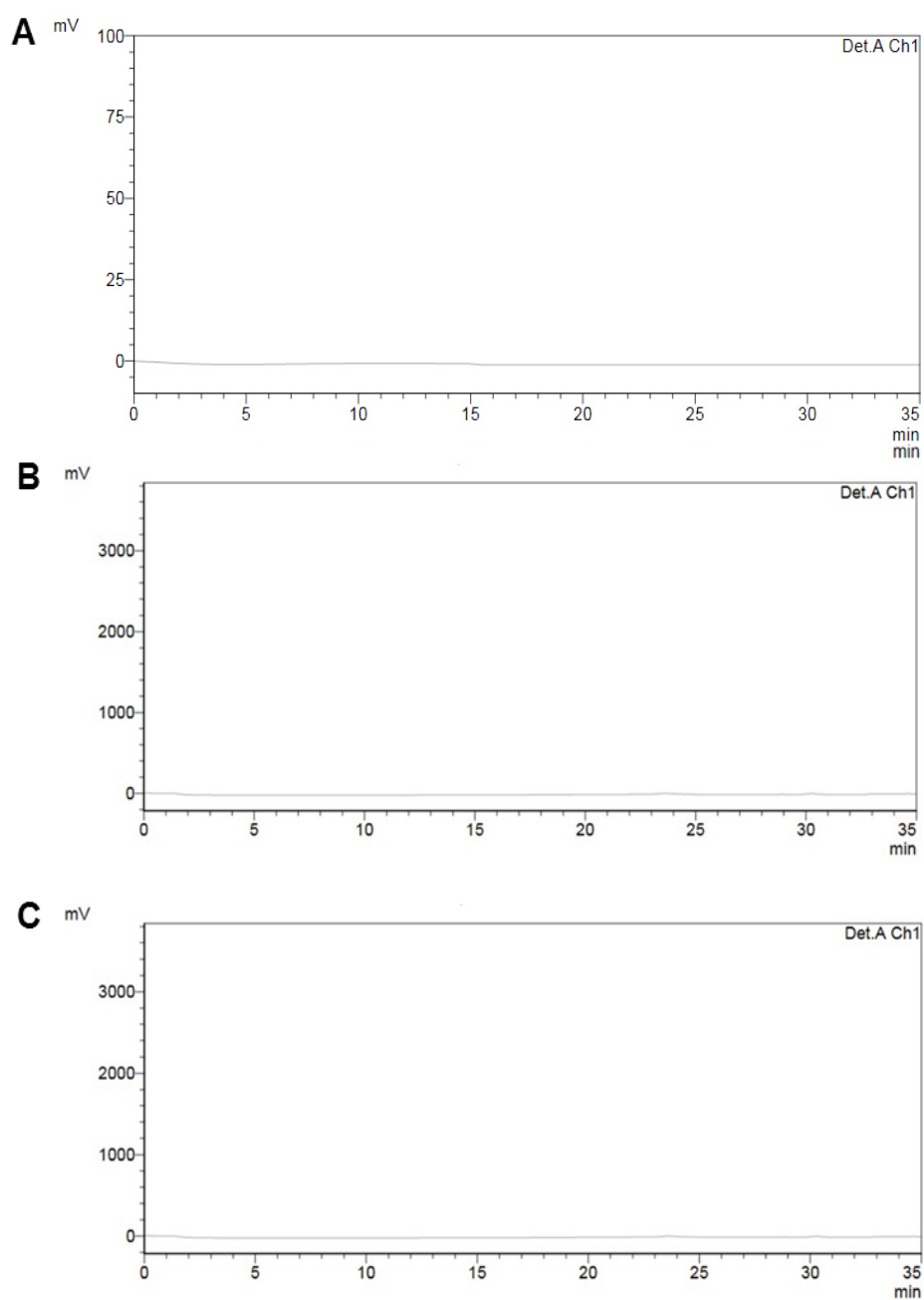
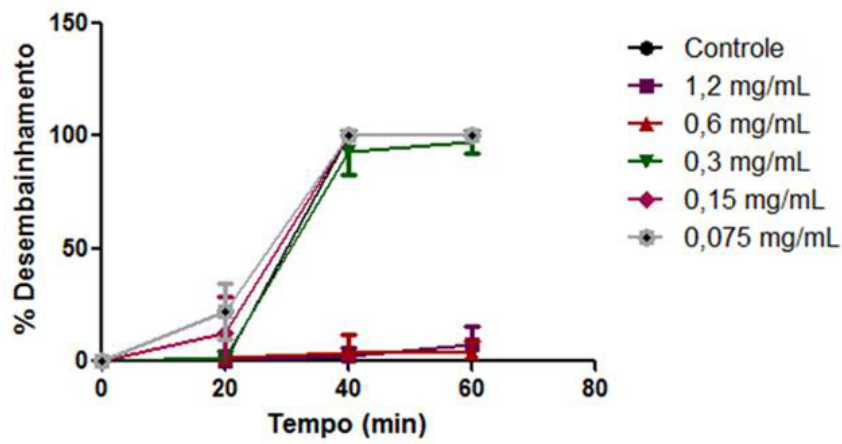
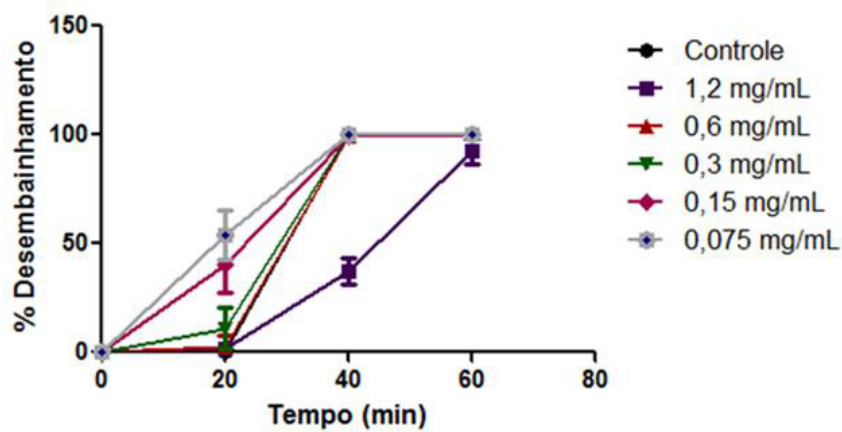


Figura 2S. Perfil cromatográfico representativo por HPLC-UV (Coluna C18, 250 μm x 4,6 μm) das frações proteicas de *Spigelia anthelmia*, acompanhado a 254 nm. (A): LPF: fração proteica de folha; (B) SPF: fração proteica de caule e (C) RPF: fração proteica de raiz.

A)



B)



C)

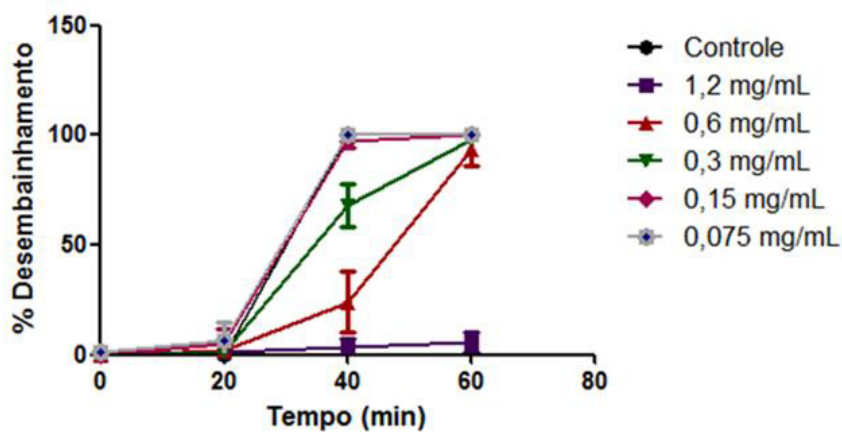


Figura 3S. Efeito da fração proteica de folhas (A), fração proteica de caule (B) e fração proteica de raiz (C) de *Spigelia anthelmia* sobre a inibição do desembainhamento *in vitro* de larvas de terceiro estágio de *Haemonchus contortus*

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A verminose gastrointestinal é atualmente o principal problema enfrentado na pecuária de pequenos ruminantes, sendo responsável por grandes impactos econômicos no mundo. Embora o principal meio de tratamento e controle ainda seja pelo uso de anti-helmínticos comerciais, muito se tem feito pela busca de novas alternativas a fim de diminuir a resistência desses parasitos aos produtos atualmente disponíveis. Neste contexto a busca por compostos bioativos provenientes de plantas vem tornando-se crescente.

A utilização de proteínas vegetais no controle de nematoides gastrintestinais vem demonstrando resultados promissores. Neste estudo verificamos que extratos e frações proteicas de *L. leucocephala* e *S. anthelmia* possuem ação anti-helmíntica sobre ovos e larvas infectantes (L₃) do parasito *H. contortus*.

Assim, concluímos que as proteínas bioativas presentes em *L. leucocephala* e *S. anthelmia* possuem propriedades farmacológicas promissoras para o controle do nematoide *H. contortus*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARROYO-LOPEZ, C. et al. Anthelmintic effect of carob pods and sainfoin hay when fed to lambs after experimental trickle infections with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. **Parasite**, v. 21, p. 71, 2014.

ACHENBACH, H. et al. Spiganthine, the cardioactive principle of *Spigelia anthelmia*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 1092-1096, 1995.

ADEMOLA, I. O.; FAGBEMI, B. O.; IDOWU, S. O. Anthelmintic activity of *Spigelia anthelmia* extract against gastrointestinal nematodes of sheep. **Parasitology Research**, v.101, p.63-9, 2007.

ALVES, W. V.; LORENZETTI, E. R.; GONÇALVES, F. C. Utilização de acaricidas a base de plantas no controle de *Rhipicephalis (Boophilus) microplus*: uma contribuição para a produção e desenvolvimento sustentável. **Revista Brasileira Agropecuária Sustentavel**, v. 2, p. 14–25, 2012.

ALMEIDA, J. L. **Revisão do gênero *Haemonchus* Cobb**, 1898: (Nematoda: Trichostrongylidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 30, n. 1, p. 57-114, 1935.

AMARANTE, A. F. T. Controle de verminose. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**. Brasília: DF, n. 34, p.19-30, 2005.

AMARANTE, A. F. T. **Nematoides gastrintestinais em ovinos**. In: Doenças Parasitárias de Caprinos e Ovinos: Epidemiologia e controle. Cavalcante, A.C.R.; Vieira, L.S.; Chagas, A,C.S. et al. Brasília, DF. Embrapa informação tecnológica, p. 19-61, 2009.

ANDRIOLA, L. C. et al. Diagnóstico de Principais Helmintos em Caprinos no Município de Grossos-RN. **Revista Científica de Produção Animal**, v.13, n.1, p.141-144, 2011.

ARULPANDI, I.; SANGEETHA, R. Antibacterial Activity of Fistulin: A Protease Inhibitor Purified from the Leaves of *Cassia fistula*. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2012, p. 4. 2012.

ASSIS, L. M. et al. Ovicidal and larvicidal activity in vitro of *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.117, p. 43-49, 2003.

BARRETO, M. A.; SILVA, J. S. Avaliação da resistência de nematódeos gastrintestinais em rebanhos caprinos do Estado da Bahia – (Resultados Preliminares). In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 1999. Salvador, BA. **Anais...** Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, p.160. 1999.

BADAR, N. et al. In Vitro and In Vivo Anthelmintic Activity of *Acacia nilotica* (L.) Willd. Ex Delile Bark and Leaves. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 31(3): p. 185-191, 2011.

BASÍLIO, I. J. L. D. et al. Caracterização morfo-anatômica de *Spigelia anthelmia* L. (Loganiaceae), espécie da medicina popular na Paraíba, Brasil. **Revista Nordestina de Biologia**, v. 17(1/2), p. 11-22, 2003.

BATISTA, F. A. H. **Isolamento e caracterização da lectina camptosemina extraída das sementes de *Camptosema ellipticum***. 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

BAURI, R.K.; TIGGA, M.N.; KULLU, S.S. A review on use of medicinal plants to control parasites. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 6(4), December, pp. 268-277. 2015.

BEHNKE, J. M. et al. Developing novel anthelmintics from plant cysteine proteinases. **Parasites & Vectors**, v. 1, p. 29, 2008.

BERGER, J. Resistance of a field strain of *Haemonchus contortus* to five benzimidazole anthelmintics in current use J.S. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 46, p. 369–37, 1975.

BHAT, G. G. et al. Purification, characterization and molecular cloning of a monocot mannose-binding lectin from *Remusatia vivipara* with nematocidal activity. **Glycoconjugate Journal**, v. 27, p. 309, 2010.

BISPO M. S., et al. 2002. Avaliação do tratamento anti-helmíntico com oxfendazole e ivermectina em rebanho caprino do Instituto Xingó-município de Piranhas-Alagoas, 2002. **Anais...** Ri ode Janeiro: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002.

BOWMAN, D. D. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. 8ª ed. São Paulo: Manole, 162 p., 2006.

BUTTLE, D. J. et al. Oral dosing with papaya latex is an effective anthelmintic treatment for sheep infected with *Haemonchus contortus*. **Parasites & Vectors**, Mar 15; v. 4, p.36, 2011.

BRAGA, F. R. et al. Statistical experimental design to assess the influence of enzymes of nematophagous fungi versus helminthes. **Research in Veterinary Science**. Dec, v. 97(3), p. 527-32, 2014.

CHAN-PÉREZ, J. I. et al. In vitro susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone: water extracts of two tannin rich plants. **Veterinary Parasitology**, v. 217, p. 53-60, 2016.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Neuromuscular effects and acute toxicity of an ethyl acetate extract of *Spigelia anthelmia* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 257–261, 2004.

CARVALHO, C. O. **Eficácia de extratos vegetais em nematódeos parasitas: avaliação in vitro em *Haemonchus contortus* e avaliação in vivo em *Strongyloides venezuelensis***. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2011.

CHAGAS, A. C. S. et al. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 103-108, 2011.

CHARLES, T. P.; POMPEU, J.; MIRANDA, D. B. Efficacy of three broad-spectrum anthelmintics against gastrointestinal nematode infections of goats. **Veterinary Parasitology**, v.34, p.71-75, 1989.

CHEN, J. et al. A novel sialic acid-specific lectin from *Phaseolus coccineus* seeds with potent antineoplastic and antifungal activities. **Phytomedicine**, v. 16, p. 352–360, 2009.

COELHO, M. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, Sep; 146 (93), p. 406–414, 2007.

COSTA, M. D.; LOVATO, P. E.; SETE, P. B. Micorrização e indução de quitinases e β -1,3-glucanases e resistência à fusariose em porta-enxerto de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.4, p.376-383, abr. 2010.

COSTA-JUNIOR, L. M.; AMARANTE, A. F. T. **Controle de Helminhos de Ruminantes no Brasil**. Paco editorial. 1 ed. 316 p. 2015.

COX, G.N. Molecular and biochemical aspects of nematode collagens. **Journal of Parasitology**, v.78, n.1, p.1–15, 1992.

CLIMENI, B. S. O. et al. Hemoncose ovina. **Editora FAEF**. São Paulo, ano 11, n. 11, jul. 2008.

DE JONG, A. J. et al. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. **The Plant Cell**, v. 4, p. 425-433, 1992.

DOMINGUES, L. F. et al. In vitro and in vivo evaluation of the activity of pineapple (*Ananas comosus*) on *Haemonchus contortus* in Santa Inês sheep. **Veterinary Parasitology**, Oct, v. 197, 1–2, (18), p. 263–270, 2013.

DOS SANTOS, V. T.; GONÇALVES, P. C. Verificação de estirpe resistente de *Haemonchus* resistente ao thiabendazole no Rio Grande do Sul (Brasil). **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária**, v.9, p.201-209, 1967.

FARIAS, M. P. O. et al. Avaliação in vitro dos efeitos do óleo da semente de *Carapa guianensis* Aubl. sobre larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos e ovinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.2, p.220-226, 2010.

FERNÁNDEZ-CASAS, F. J. **El género *Spigelia* Linnaeus (1753) en el herbario FPU** (Recife, Pernambuco, Brasil). *Adumbr. Summæ Ed.* 54: 1-26, 2014.

FERREIRA, L. E. et al. In vitro anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. **Experimental Parasitology** 134, 327–332. 2013.

FERREIRA, L. E. et al. *Thymus vulgaris* L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from sheep. **Veterinary Parasitology**, Sep 15; 228: p.70-76, 2016.

FETTERER, R. H.; RHOADS, M. L. Biochemistry of the nematode cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. **Veterinary Parasitology**, Feb, v. 46(1-4), p. 103-11,1993.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**.4 ed. Icone, 696p. 2004.

FROST, R. G. et al. Purification of *Ulex europeus* hemagglutinin I by affinity chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 170-179, 1975.

GAUDIN, E. et al. Efficacy of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) pellets against multi resistant *Haemonchus contortus* and interaction with oral ivermectin: Implications for on-farm control. **Veterinary Parasitology**, Aug, v. 227, 30, p. 122–129, 2016.

GALLAGHER, J. T. Carbohydrate-binding properties of lectins: a possible approach to lectin nomenclature and classification. **Bioscience Reports**, Aug, v. 4 (8), p. 621-32, 1984.

GAMAL-ELDEEN, A. M. et al. Antiproliferative and cancer-chemopreventive properties of sulfated glycosylated extract derived from *Leucaena leucocephala*. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, p. 805–811, 2007.

GEORGE, J. R. **Parasitologia Veterinária**. 4.ed. São Paulo: Manole. 379p. 1998.

GEURDEN, T. et al. Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastrointestinal nematodes in France, Greece and Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1/2, p. 59-66, 2014.

GORTARI, M. C.; HOURS, R. A. Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. A review. **Mycological Progress**, v. 7, p. 221-238, 2008.

HABIB, H.; FAZILI, K. M. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v.2, p.68-85, 2007.

HAMID, R. et al. Lectins: proteins with diverse applications. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, p. 93-103, 2013.

HEIM, C. et al. Inhibition of *Haemonchus contortus* larval development by fungal lectins. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 425, 2015.

HENRISSAT, B. **Classification of chitinase modules**. In: JOLLES, P.; MUZZARELLI, R. A. editors. Chitin and Chitinases. Switzerland: Burkhauser Basel, p. 137–56, 1999.

HOSTE, H. et al. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. **Veterinary Parasitology**, v. 212, p. 5-17. 2015.

HOGADE, M. G. et al. In vitro Anthelmintic Activity of Bark of *Azadirachta indica* against *Ascardi galli* and *Eudrilus eugeniae*. **Journal of Natural Remedies**, Jan, v. 14 (1), 2014.

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Anuário Estatístico 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 28 de setembro de 2016.

IRUM, S. et al. Anthelmintic activity of *Artemisia vestita* Wall ex DC. and *Artemisia maritima* L. against *Haemonchus contortus* from sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 212, p. 451–455, 2015.

IQBAL, Z. et al. In vivo anthelmintic activity of *Azadirachta indica* A. Juss seeds against gastrointestinal nematodes of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 168: p. 342-345, 2010.

IZUHARA, K. et al. Involvement of cysteine protease inhibitors in the defense mechanism against parasites. **Medicinal Chemistry**, Jul;4 (4):322-7. 2008.

JABBAR, A. et al. Anthelmintic resistance: The state of play revisited. **Life Sciences**, v. 79, n. 26, p. 2413-2431, 2006.

JIANG, S. Y.; MA, Z.; RAMACHANDRAN, S. Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. **BMC Evolutionary Biology**, Mar, v. 18, p.10:79, 2010.

JUNWEI, W. et al. The recombinant serine protease XAoz1 of *Arthrobotrys oligospora* exhibits potent nematicidal activity against *Caenorhabditis elegans* and *Haemonchus contortus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 344, p. 53–59, 2013.

KAMARAJ, C. et al., Ovicidal and larvicidal activity of crude extracts of *Melia azedarach* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). **Parasitology Research**, v. 106, p. 1071-1077, 2010.

KATIKI, L. M. et al. Evaluation of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil in lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, May 25;186(3-4):312-8, 2012.

KEMP, J. M. et al. The relationship between the rapid rejection of *Haemonchus contortus* larvae with cells and mediators in abomasal tissues in immune sheep. **International Journal for Parasitology**, v.39, n.14, p.1589-1594, 2009.

KERBOUEF, D.; HUBERT, J. Benzimidazole resistance of field strains of nematodes from goats in France. **Veterinary Records**. v.116, n. 5, p. 133, 1985.

KETTLE, P. R. et al. A survey of nematode control of measure used by milking goats farmers and of anthelmintic resistance on their farms. **Journal Zoology Veterinary**, v.31, n.8, p.139- 143, 1983.

KIM, J. Y. et al. Protease Inhibitors from Plants with Antimicrobial Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 2860-2872, 2009.

KUMARASINGHA, R. et al. Anthelmintic activity of selected ethno-medicinal plant extracts on parasitic stages of *Haemonchus contortus*, **Parasites & Vectors**, 9:187. 2016.

KARUMARI, R. J.; VIJAYALAKSHMI, K.; LASUBRAMANIAN, S. E. Preliminary phytochemical analysis and anthelmintic activity of the aqueous extract of *Ocimum sanctum* (Linnaeus, 1767) leaves (green and black) against *Cotylophoron cotylophorum* (Fischöeder, 1901). **International Journal of pharma and bio sciences**, v. 5(2), p. 580, 2014.

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Jan; v. 89(1): p. 45–55. 2011.

LAWRENCE, P. K., KOUNDAL, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 15, 2002.

LIANG, L. et al. The crystal structures of two cuticle-degrading proteases from nematophagous fungi and their contribution to infection against nematodes. **The FASEB Journal**, May; v. 24(5), p. 1391-400, 2010.

LICHTENFELS, J. R.; et al. New morphological characters for identifying individual specimens of *Haemonchus* spp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) and a key to species in ruminants of North America. **Journal Parasitology**, n. 80, v. 1, p.107-119, 1994.

LIMA, M. E. et al. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Aug, v. 10; 53(16), p. 6414-9, 2005.

LIMA-JÚNIOR, D. M.; et al. Fatores anti-nutricionais para ruminantes. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n. 3, p.132-143, 2010.

LONE, B. A. et al. In vitro and in vivo anthelmintic activity of *Euphorbia helioscopia* L. **Veterinary Parasitology**, v. 189, p. 317-321. 2012.

LIN, R. J. et al. Anthelmintic constituents from ginger (*Zingiber officinale*) against *Hymenolepis nana*. **Acta Tropica**, v. 140, p. 50-60, 2014.

LÓPEZ-GARCÍA, B.; HERNÁNDEZ, M.; SEGUNDO, B. S. Bromelain, a cysteine protease from pineapple (*Ananas comosus*) stem, is an inhibitor of fungal plant pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, Jul; v. 55(1): p. 62-7, 2012.

MARTÍNEZ-ORTÍZ- DE-MONTELLANO, C., et al. Effect of a tropical tannin-rich plant, *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 283–290, 2010.

MABBERLEY, D. J. **The plant Book**, 2 nd Ed., Cambridge University Press, UK ISBN 0-521-411421-0. 1997.

MACEDO, K. M. et al. Controle in vitro e in vivo de *Haemonchus contortus* com extrato aquoso das folhas de *Mangifera indica* L. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 7, n. 1, jan./abr, 2015.

MALEK, K. et al. Cysteine Proteases from *Carica papaya*: An important enzyme group of many industrial applications. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, Mar, v. 11(2):p. 11-16, 2016.

MANSFIELD LS, GAMBLE HR, FETTERER RH. Characterization of the egg shell of *Haemonchus contortus* - I. Strutural components. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 103(3): p. 681-686, 1992.

MARIE-MAGDELEINE C, et al. In vitro effects of *Tabernaemontana citrifolia* extracts on *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, v. 89(1): p. 88–92. 2010.

MARTÍNEZ-VALLADARES, M. et al. The present status of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematode infections of sheep in the northwest of Spain by in vivo and in vitro techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 191, n. 1/2, p. 177-181, 2013.

MARTINEZ-ORTIZ-DE-MONTELLANO, C. **Mecanismos de acción de las plantas ricas en taninos sobre lacpoblación adulta de nematodos gastrointestinales de**

los pequenos ruminantes. TESE - Doutorado em Ciências Agropecuárias, Universidade de Toulouse, p. 145, 2010.

MATTOS, M. J. T.; CASTRO, E. S. Utilização de anti-helmínticos no controle de verminose caprina no Estado do Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, 22 ed., n. 130, p.52-54, 2002.

MERCER, C. F.; GREENWOOD, D. R.; GRANT, J. L. Effect of Plant and Microbial Chitinases On the Eggs and Juveniles of *Meloidogyne Hapla* Chitwood (Nematoda: Tylenchida). **Nematologica**, v. 38 (1), p. 227 – 236, 1992.

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L. Abordagem genética da resistência anti-helmíntica em *Haemonchus contortus*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 100 (555-556) p.141-146, 2005.

MENDOZA, W. et al. Estudios Estructura y Función de una Lectina aislada de semillas de *Caesalpinia spinosa* Kuntze (Tara). **Idesia**, v. 25 (2): p. 50-4, 2007.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2016. DISPONÍVEL EM: <http://www.agricultura.gov.br>, acesso em: 15 out. 2016.

MORAIS, S. L., et al. Chemical investigation of *Spigelia antlemia* Linn. used in Brazilian Folk medicine as an anthelmintic. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, 81–82. 2002.

MOVAFAGH A., et al. The structure Biology and Application of Phytohemagglutinin (PHA) in Phytomedicine: With special up-to-date references to lectins. **Journal of Paramedical Sciences**, v. 4. 2013.

MOLENTO, M. B., et al. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, abr./jun, v. 80, n. 2, p.253-263, 2013.

MONTEIRO, M. V. B. et al. Anthelmintic activity of *Jatropha curcas* L. seeds on *Haemonchus Contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.182, p. 259– 263, 2011.

NEHDI, I. A.; SBIHI, H.; TAN, C. P, AL-RESAYES, S. I. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit seed oil: Characterization and uses. **Industrial Crops and Products**, v. 52: p. 582– 587. 2014.

NOGUEIRA, D. M.; MOREIRA, J. N.; CARLOS, J. F. Avaliação de Plantas Medicinais no Controle de Nematódeos Gastrintestinais de Caprinos Criados em Sistema de Base Agroecológica. **Revista Científica de Produção Animal**, v.8, n.2, 2006.

OLIVEIRA, L. M. B. et al. Effect of six tropical tanniferous plant extracts on larval exsheathment of *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, abr.-jun. v. 20, n. 2, p. 155-160, 2011.

ORTIZ-OCAMPO, G.I.; Efecto antihelmíntico in vitro e in vivo de residuos de *Coffea arabica* sobre un aislado de *Haemonchus contortus* con baja susceptibilidad a taninos. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 19, n.1, p. 41-50, 2016.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347-352, 1995.

PEREIRA, C. S. **Avaliação da presença de resistência anti-helmíntica em um rebanho de ovino no município de Porto Velho** – Dissertação de mestrado – Universidade de Brasília – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2011.

RAKASHANDA, S.; AMIN, S. Proteases as Targets in Anticancer Therapy Using Their Inhibitors. **Journal of Life Sciences**, v. 5(2): p. 133-138, 2013.

RAKASHANDA, S. et. al. Role of proteases in cancer: A review. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 7(4), p. 90-101, 2012.

RABIU, H.; SUBHASISH, M. Investigation of in Vitro Anthelmintic activity of *Azadirachta Indica* leaves. **International Journal of Drug Development & Research**, Oct-Dec, v. 3 (4): p. 94-100, 2011.

RADWAN, N. A.; KHALIL, A. I.; WAHDAN, A. E. In Vitro evaluation of antihelmintic activity of *Allium sativum* against adult *Cotylophoron cotylophorum* (Paramphistomidae), **PUJ**, v. 5(2), p.135-146, 2012.

RHOADS, M. L.; FETTERER, R. H. Biochemical and immunochemical characterization of 125I-labeled cuticle components of *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 42: p. 155-164.1990.

RÍOS-DE ÁLVAREZ, L. et al. In vitro screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties. **Veterinary Parasitology**, v. 186(3–4), p. 390–8, 2012.

RODRÍGUEZ, A. V. Early detection of *Haemonchus contortus* infection in sheep using three different faecal occult blood tests. **Open Veterinary Journal**, v. 5(2): 90-97, 2015.

ROEBER, F.; JEX, A. R.; GASSER, R. B.; Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1135–1152, 2013.

ROGERS, W. P.; SOMMERVILLE, R. I. The physiology of the second ecdysis of parasitic nematodes. **Parasitology**, v.50, p. 329-348, 1962.

ROGERS, W. P. **The Nature of Parasitism**. New York, London: Academic Press. 1962.

ROGERS, W. P. The role of leucine aminopeptidase in the moulting of nematode parasites. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 14, p. 311-21, 1965.

ROGERS, W. P., **Exsheathment and hatching mechanisms in helminths**. In *Biology of Parasites*. (ed. E. J. L. Soulsby), New York, London: Academic Press. p. 33-40, 1966.

ROGERS W. P.; BROOKS, F. The mechanism of hatching of eggs of *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v. 7(1): p. 61-65, 1977.

SADDIQLI, H.A. et al. Small ruminant resistance against gastrointestinal nematodes: a case of *Haemonchus contortus*. **Parasitology Research**, v.109, p.1483–1500, 2011.

SAFWAT, A. M. et al. Estimating Apparent Nutrient Digestibility of Diets Containing *Leucaena leucocephala* or *Moringa oleifera* Leaf Meals for Growing Rabbits by Two Methods. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Aug, v. 28(8): p. 1155–1162, 2015.

SHAMANSKY, L. M. Cuticle collagen genes of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans* are highly conserved. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 37(1): p. 73-85, 1989.

SHAZIYA B, GOYAL P K, Anthelmintic effect of natural plant (*Carica papaya*) extract against the gastrointestinal nematode, *Ancylostoma caninum* in mice. **Journal of Biological Sciences**, v. 1(1), p. 2-6, 2012.

SHALABY, H. A. et al. In vitro efficacy of combination of Ivermectin and *Nigella sativa* oil against helminth parasites, **Global Veterinaria**, v. 9(4), p. 465-473, 2012.

SHALABY, H. A.; FARAG, T. K. Body surface changes in gastrointestinal helminthes following in vitro treatment with *Allium sativum* oil. **Journal of Veterinary Science & Technology**, v. 5, p. 153, 2014.

SHARMA, N. et al. Role of chitinase in plant defense. **Asian Journal of Chemistry**, v. 6(1): p. 29-37, 2011.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Fatores Antinutricionais: Inibidores de proteases e lectinas. **Revista de Nutrição**, v. 13(1): p. 3-9, 2000.

SILVA, J. V. **Caracterização dos sistemas de produção de ovinos e caprinos no Estado do Maranhão**. Tese (Doutorado em Zootecnia) – 2011, 110p. Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

SISSAY, M. M. et al. Anthelmintic resistance of nematode parasites of small ruminants in eastern Ethiopia: exploitation of refugia to restore anthelmintic efficacy. **Veterinary Parasitology**, v. 135, 3-4: p. 337-346, 2006.

SOARES, A. M. S. Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* protein extracts on *Haemonchus contortus*. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 24, p. 396-401, 2015.

SOISSON, S. M. et al. Structural definition and substrate specificity of the S28 protease family: the crystal structure of human prolylcarboxypeptidase. **BMC Structural Biology**, 10:16. 2010.

STEPEK, G. et al. Anthelmintic action of plant cysteine proteinases against the rodent stomach nematode, *Protospirura muricola*, in vitro and in vivo. **Parasitology** v. 134, p. 103-112. 2007.

SYAMSUDIN RS, PARTOMUAN S. Antidiabetic activity of active fractions of *Leucaena leucocephala* (Imk) Dewit seeds in experiment model. **European Journal of Scientific Research**, v. 43(3): p. 384–391, 2010.

TAYLOR, M. A. et al. **Parasitologia veterinária**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 742 p. 2009.

TAYLOR, M. A. Parasitological examinations in sheep health management. **Small Ruminant Research**, v. 92, n. 1, p. 120-125, 2010.

THARANATHAN, N.R.; KITTER, F.S. Chitin: the undisputed biomolecule of great potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 61-87, 2003.

THEODORIDES, V. J.; SCOTT, G. C.; LADERMAN, M. Efficacy of parbendazole against gastrointestinal nematodes in goats. **Journal veterinary**, v. 31, n.5, p. 857-863, 1970.

THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Resistance of gastrointestinal nematodes of anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 41-47, 2004.

TREMACOLDI, C. R. et al. Purification and properties of an alkaline protease of *Aspergillus clavatus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 295–299, 2007.

VASCONCELOS, E. A. R. **Evolução molecular na interação planta-praga: uma nova proteína inibidora de xilanase (xip), similar a quitinases de classe iii de plantas, que afeta a germinação de esporos da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*)** – Dissertação do Programa de Pós-graduação em Biologia molecular – Universidade de Brasília, 2011.

VEGLIA, F. The anatomy and life-history of the *Haemonchus contortus* (Rud). **Third and Fourth Annual Reports of the Director of Veterinary Research**, p. 349-500, 1915.

VIEIRA, L. S. **Atividade ovicida in vitro e in vivo dos benzimidazóis; oxfendazole, fenbendazole, albendazole e thiabendazole em nematódeos gastrintestinais de caprinos.** 1986. 115f. Tese, (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1986.

VON-SON-DE-FERNEX, S. et al. Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the ultrastructural damage generated to eggs of *Cooperia* spp. **Veterinary Parasitology**, Oct, v. 214(1), p. 143, 2015.

WHITNEY, T.R.; WILDEUS, S.; ZAJAC, A.M. The use of redberry juniper (*Juniperus pinchotii*) to reduce *Haemonchus contortus* fecal egg counts and increase ivermectin efficacy. **Veterinary Parasitology**, v. 197, 1–2, 18, p.182–188, 2013.