



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

**AÇÃO DE PROTEASE DO LÁTEX DE *Ficus benjamina* L.
SOBRE NEMATÓDEO E BACTÉRIAS DE INTERESSE NA
PRODUÇÃO ANIMAL**

LÊDIA FEITOSA WANDERLEY

Chapadinha, MA

2016

LÊDIA FEITOSA WANDERLEY

**AÇÃO DE PROTEASE DO LÁTEX DE *Ficus benjamina* L.
SOBRE NEMATÓDEO E BACTÉRIAS DE INTERESSE NA
PRODUÇÃO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Alexandra Martins dos Santos Soares

Chapadinha, MA

2016

Wanderley, Lêdia Feitosa.

Ação de protease do látex de *Ficus benjamina* L. sobre nematódeo e bactérias de interesse na produção animal / Lêdia Feitosa Wanderley. - 2016.

85 f.

Orientador(a): Alexandra Martins dos Santos Soares.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (25.06)/ccaa, Universidade Federal do Maranhão, Capadinha, 2016.

1. Antibacteriano. 2. Anti-helmíntico. 3. Pecuária.
4. Proteína. I. Soares, Alexandra Martins dos Santos.
II. Título.

LÊDIA FEITOSA WANDERLEY

**AÇÃO DE PROTEASE DO LÁTEX DE *Ficus benjamina* L.
SOBRE NEMATÓDEO E BACTÉRIAS DE INTERESSE NA
PRODUÇÃO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Aprovada em: 21/11/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Alexandra Martins dos Santos Soares (Orientadora)

Doutora em Biotecnologia
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Livio Martins Costa Junior

Doutor em Parasitologia
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Danilo Rodrigues Barros Brito

Doutor em Ciência Animal
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão

“... As coisas que são impossíveis aos homens são possíveis a Deus.”

Lucas 18:27.

A aquela que me gerou em seu coração, Antonia Angela de Sousa,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela imensidão do seu amor e presença amiga constate;

À professora Dr^a. Alexandra Martins dos Santos Soares, orientadora desta pesquisa;

Ao professor Dr. Livio Martins Costa Junior e às alunas Carolina Rocha e Silva e Sara Raquel Dutra Macedo do Laboratório de Parasitologia Animal da Universidade Federal do Maranhão;

Às professoras Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa e Ilka Maria Vasconcelos e à aluna Helen Paula Silva da Costa do Laboratório de Toxinas Vegetais da Universidade Federal do Ceará;

Ao professor José Tadeu Abreu de Oliveira do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa da Universidade Federal do Ceará;

Aos pesquisadores André Teixeira da Silva Ferreira e Jonas Perales do Laboratório de Toxinologia da FIOCRUZ;

Aos professores Danilo Rodrigues Barros Brito e Paulo Vitor Soeiro Pereira da Universidade Federal do Maranhão;

Aos alunos do Laboratório de Bioquímica Vegetal, Sandra Araújo, Isaias Figueiredo, Ananda Barbosa, Rute Sayuri Kano, Alinne Santana, Gessica Marinho, Marilene Sousa e Gabriel de Oliveira;

Aos estudantes que fizeram parte da turma 2015.1: Raimunda Alves Silva, Romário Matos, Karlyene Rocha, Jéssica Sousa, Talles Carvalho, Itamara França, Francisca Gonçalves, Hélida Gomes, Janayra Silva e Lucas Fernandes;

A toda minha amada família. E em especial à minha mãe, Antonia Angela;

À FAPEMA pelo suporte financeiro.

O meu sincero obrigada a todos por todas as colaborações, parcerias e amizade.

SUMÁRIO

	p.
CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Nematodiose gastrointestinal em pequenos ruminantes.....	14
2.2 Infecções por bactérias patogênicas.....	18
2.3 <i>Ficus benjamina</i>	21
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 Geral.....	23
3.2 Específicos.....	23
CAPÍTULO II – Potencial de proteínas exógenas no controle de nematóides gastrointestinais (manuscrito elaborado de acordo com as diretrizes da revista Veterinary Parasitology).....	24
1 Introdução.....	24
2 Proteínas com potencial farmacológico.....	26
3 Proteínas no controle de nematóides gastrointestinais.....	27
3.1 Proteases.....	29
3.2 Quitinases.....	32
3.3 Lectinas.....	33
3.4 Proteínas Cry.....	34
3.5 Peptídeos.....	36
4 Formulação e administração oral de fármacos proteicos.....	37
5 Considerações finais.....	38
Referências.....	39
CAPÍTULO III - Obtenção de protease do látex de <i>Ficus benjamina</i> com ação sobre <i>Haemonchus contortus</i> (manuscrito elaborado de acordo com as diretrizes da revista Veterinary Parasitology).....	48
1 Introdução.....	49
2 Material e Métodos.....	51

2.1	Obtenção do látex e extração das proteínas solúveis.....	51
2.2	Fracionamento com sulfato de amônio.....	51
2.3	Atividade proteolítica.....	51
2.4	Fracionamento por cromatografia.....	52
2.5	Determinação do teor proteico.....	52
2.6	Eletroforese em gel de poliacrilamina (SDS-PAGE).....	52
2.7	Determinação do pH e temperatura ótimos da FbP.....	53
2.8	Identificação e determinação da massa molecular.....	53
2.9	Teste de desenvolvimento larvar.....	53
2.10	Análise estatística.....	54
3	Resultados.....	54
3.1	Obtenção e caracterização da FbP.....	54
3.2	Atividade biológica.....	57
4	Discussão.....	58
	Referências.....	61
	Material Suplementar.....	64
CAPÍTULO IV – Efeito antimicrobiano de protease cisteínica do látex de <i>Ficus benjamina</i> (manuscrito elaborado de acordo com as diretrizes da Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária).....		
1	Introdução.....	66
2	Material e Métodos.....	67
2.1	Obtenção das proteínas solúveis do látex.....	67
2.2	Determinação do teor de proteínas.....	68
2.3	Fracionamento por precipitação com sulfato de amônio.....	68
2.4	Obtenção da fração protease.....	68
2.5	Ensaio de inibição do crescimento bacteriano.....	69
3	Resultados e Discussão.....	69
	Referências.....	72
	Material Suplementar.....	75
CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....		
REFERÊNCIAS.....		

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- BOD – Demanda bioquímica de oxigênio (do inglês, Biochemical Oxygen Demand)
- BSA – Albumina sérica bovina (do inglês, Bovine Serum Albumin)
- FbP – Protease cisteínica de *Ficus benjamina* (do inglês, *Ficus benjamina* Protease)
- IC₅₀ – Concentração que inibe o desenvolvimento de 50% das larvas
- 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
- MIC – Mínima concentração inibitória (do inglês, Minimal Inhibitory Concentration)
- PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida (do inglês, PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)
- SA – Sulfato de amônio
- SDS – Dodecil sulfato de sódio (do inglês, Sodium Dodecyl Sulfate)
- UFC – Unidades formadoras de colônia
- UR – Umidade relativa

LISTA DE TABELAS

p.

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Proteínas e peptídeos com ação sobre nematóides gastrointestinais que habitam nas diferentes regiões do trato digestório de animais.....	29
---	----

CAPÍTULO III

Tabela 1 – Teor de proteínas e atividade proteolítica das amostras proteicas obtidas a partir do látex de <i>Ficus benjamina</i>	55
Tabela 2 – Similaridade da FbP com outras proteases cisteínicas de plantas.....	56
Tabela 3 – Eficácia média das amostras proteicas obtidas látex de <i>Ficus benjamina</i> na inibição do desenvolvimento de larvas de <i>Haemonchus contortus</i>	58

LISTA DE FIGURAS

p.

CAPÍTULO I

Figura 1 – Ovo, larva de primeiro estágio e adultos de <i>Haemonchus contortus</i> na mucosa do abomaso.....	15
Figura 2– Ciclo biológico do nematóide <i>Haemonchus contortus</i>	16
Figura 3 – Classificação taxonômica e imagem de um exemplar da espécie <i>Ficus benjamina</i>	21

CAPÍTULO III

Figura 1 – SDS-PAGE (12%) das frações utilizadas para obtenção da FbP.....	56
Figura 2 – Caracterização para temperatura e pH ótimos de atividade da FbP.....	57
Figura 1S – Obtenção do extrato do látex, das frações proteicas e da FbP a partir do látex de <i>Ficus benjamina</i>	64
Figura 2S – Perfil de eluição da fração sulfato de amônio 60-90% em coluna de CM-Cellulose e atividade proteolítica das frações cromatográficas.....	65

CAPÍTULO IV

Figura 1 – Crescimento das bactérias <i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterobacter aerogenes</i> na presença de concentrações da FbP.....	71
Figura 1S – Crescimento das bactérias <i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterobacter aerogenes</i> na presença de concentrações do extrato proteico do látex de <i>Ficus benjamina</i> , EPL; da fração obtida com a saturação do EPL com 30-60% de sulfato de amônio, a F30-60; e da fração obtida com a saturação do EPL com 60-90% de sulfato de amônio, a F60-90.....	75

RESUMO

Helmintoses e infecções bacterianas são um grande desafio para a produção pecuária porque provocam perda de produtividade nos rebanhos. Para reduzir prejuízos, os produtores realizam o controle de parasitos e bactérias principalmente utilizando produtos químicos sintéticos, mas a resistência aos princípios ativos desses produtos insta a busca contínua por moléculas biologicamente ativas. Essa pesquisa foi conduzida com o objetivo de obter frações proteicas e protease a partir do látex de *Ficus benjamina*, além de avaliar uso potencial dessas amostras proteicas no controle do nematóide parasito de pequenos ruminantes, *Haemonchus contortus*, bem como sobre as bactérias patogênicas *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* e *Enterobacter aerogenes*. O látex foi obtido a partir de uma incisão feita no ápice do galho das plantas e coletado em tampão fosfato de sódio (75 mM, pH 7,0). O látex foi centrifugado (12.000 x g a 4 °C por 15 min), dialisado contra água (cut-off 14 kDa), novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores e, então, denominado EPL (Extrato Proteico do Látex). O EPL foi fracionado com sulfato de amônio a 30-60% e 60-90% de saturação para a obtenção das frações denominadas F30-60 e F60-90, respectivamente. A F60-90 foi fracionada por cromatografia de troca iônica em matriz de CM-Cellulose e a fração com maior atividade proteolítica obtida foi denominada FbP (*Ficus benjamina* Protease). De posse dessas frações, foram conduzidos ensaios de análise de proteínas, atividade proteolítica e identificação da FbP. Adicionalmente foram realizados ensaios de inibição do desenvolvimento larvar do nematódeo *H. contortus* e inibição do crescimento das bactérias *S. enterica*, *S. aureus* e *E. aerogenes* em meio líquido. Os teores de proteína totais obtidos foram, respectivamente, 121,6, 21,2, 75,7 mg para EPL, F30-60 e F60-90. A atividade proteolítica das amostras proteicas foi de 43.471, 13.245 e 57.857 UA/mL/mgP para EPL, F30-60 e F60-90, respectivamente. A FbP apresentou atividade proteolítica de 36.393,8 UA/mL/mgP. A análise em gel mostrou a FbP com uma banda proteica com massa entre 20 e 30 kDa e por espectrometria de massa identificou-se a FbP como protease cisteínica, com massa molecular de 23,97 kDa. FbP manteve atividade proteolítica estável na faixa de pH entre 6 e 10 e em uma ampla faixa de temperatura, com atividade ótima à 60 °C. Em testes de inibição do desenvolvimento larvar, EPL, F30-60, F60-90 e a FbP apresentaram IC₅₀ de 0,22, 1,38, 0,42 e 0,26 mg/mL, respectivamente. Foi verificado que EPL, F30-60 e F60-90 não exerceram ação inibitória sobre o crescimento das bactérias, mas FbP inibiu o crescimento de *S. aureus* e *S. enterica* com mínima concentração inibitória (MIC) de 3,12 µg/mL. Conclui-se que a FbP obtida a partir do látex de *F. benjamina* possui propriedades biológicas promissoras para o desenvolvimento de produtos que possam ser utilizados no controle do nematóide gastrointestinal, *H. contortus*, e das bactérias patogênicas *S. aureus* e *S. enterica*.

Palavras-chave: Proteína, Anti-helmíntico, Antibacteriano, Pecuária.

ABSTRACT

Helminthes and bacterial infections are a major challenge for livestock production because they cause loss of productivity in herds. To reduce losses, producers control parasites and bacteria mainly using synthetic chemicals, but the resistance to the active principles of these products calls for the continuous search for biologically active molecules. This research was conducted with the objective of obtaining protein fractions and protease from the latex of *Ficus benjamina*, in addition to evaluating the potential use of these protein samples in the control of the parasite nematode of small ruminants, *Haemonchus contortus*, as well as on the pathogenic bacteria *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter aerogenes*. Latex was obtained from an incision made at the apex of the plant limb and collected in sodium phosphate buffer (75 mM, pH 7.0). The latex was centrifuged (12,000 x g at 4 ° C for 15 min), dialysed against water (14 kDa cut-off), again centrifuged under the same conditions as before and then referred to as EPL (Latex Protein Extract). The EPL was fractionated with ammonium sulphate at 30-60% and 60-90% saturation to obtain the fractions denominated F30-60 and F60-90, respectively. F60-90 was fractionated by ion exchange chromatography on CM-Cellulose matrix and the fraction with the highest proteolytic activity obtained was denominated FbP (*Ficus benjamina* Protease). With these fractions, protein analysis, proteolytic activity and FbP identification were carried out. In addition, inhibition of larval development of the nematode *H. contortus* and inhibition of the growth of *S. enterica*, *S. aureus* and *E. aerogenes* in a liquid medium were carried out. The total protein levels obtained were, respectively, 121.5, 21.2, 75.7 mg for EPL, F30-60 and F60-90. The proteolytic activity of the protein samples was 43,471, 13,245 and 57,857 UA/mL/mgP for EPL, F30-60 and F60-90, respectively. The FbP presented proteolytic activity of 36,393.8 AU/mL/mgP. Gel analysis showed FbP with a protein band with mass between 20 and 30 kDa and by mass spectrometry the FbP was identified as cysteine protease, with a molecular weight of 23.97 kDa. FbP maintained stable proteolytic activity in the pH range between 6 and 10 and over a wide temperature range, with optimum activity at 60 °C. In tests for inhibition of larval development, EPL, F30-60, F60-90 and FbP presented IC₅₀ of 0.22, 1.38, 0.42 and 0.26 mg/mL, respectively. It was verified that EPL, F30-60 and F60-90 did not exert an inhibitory action on the growth of bacteria, but FbP inhibited the growth of *S. aureus* and *S. enterica* with minimum inhibitory concentration (MIC) of 3.12 µg/mL. It is concluded that FbP obtained from latex of *F. benjamina* has promising biological properties for the development of products that can be used in the control of the gastrointestinal nematode, *H. contortus*, and the pathogenic bacteria *S. aureus* and *S. enterica*.

Keywords: Protein, Anthelmintic, Antibacterial, Livestock.

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com grande capacidade produtiva devido às condições edafoclimáticas favoráveis e extenso território. Com o maior rebanho bovino comercial do mundo, a pecuária se destaca como um dos setores de maior importância econômica do Brasil (MAPA, 2016). A criação de caprinos e ovinos também tem ganhado destaque no agronegócio nacional. Estima-se que os rebanhos caprino e ovino contam com um efetivo de aproximadamente 18 milhões e 9 milhões de animais, respectivamente. Grande parte dos rebanhos está concentrada na região Nordeste, que responde por 57% do rebanho ovino e 91% do rebanho caprino (IBGE, 2014). Nesta região a caprinocultura é favorecida pela adaptação dos animais às regiões semi-áridas (SOUZA, 2007).

Um dos fatores limitantes para a produtividade dos rebanhos, em países tropicais como o Brasil, são as infecções parasitárias causadas por nematóides gastrintestinais, bem como as infecções provocadas por microorganismos patogênicos. Nesse aspecto, para que a produção animal seja viável, é necessário, portanto, o controle dos parasitos de elevada patogenicidade, o que envolve práticas adequadas de manejo sanitário e alimentar, bem como a utilização de anti-helmínticos e antibióticos, quando necessário (ANDREOTTI; NICODEMO, 2004; MINHO, 2014). No entanto, o que tem se observado, por parte dos produtores, é o uso indiscriminado de produtos químicos sintéticos como principal método de controle dos parasitos, mas essa prática tem condicionado o aparecimento de linhagens de parasitos resistentes aos princípios ativos dos medicamentos do mercado (MELO et al., 1998; RODRIGUES et al., 2007).

É nesse contexto que se torna necessária a busca por compostos bioativos no combate às infecções e verminoses que sejam eficientes, sobretudo em populações onde se observa o fenômeno da resistência. As espécies vegetais possuem diversos compostos que são ativos no controle de patógenos e parasitos naturais e que, também, podem ser usados no controle de nematóides (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005) e bactérias (FRIEDMAN et al., 2002) que acometem animais. O uso de fitoterápicos na produção animal é uma alternativa que poderá

prolongar a vida útil dos anti-helmínticos e antibióticos do mercado (VIEIRA, 2005). Assim, esse trabalho foi desenvolvido com o intento de ampliar o entendimento acerca do controle de infecções parasitárias e bacterianas utilizando proteínas bioativas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nematodiose gastrointestinal em pequenos ruminantes

A criação de pequenos ruminantes é uma prática de importância sócio-econômica em todo mundo, mas está susceptível à ineficiência biológica e econômica provocadas pelo estabelecimento de infecções parasitárias por nematóides gastrointestinais. No nordeste brasileiro, o emprego de tecnologias na produção de caprinos e ovinos ainda é baixo. A criação dos animais se dá, principalmente, em regime extensivo, onde os animais se alimentam em áreas de pastagem nativa, com pouca ou nenhuma suplementação na dieta na época seca (GIRÃO et al., 1998).

No Brasil, larvas infectantes estão disponíveis na pastagem praticamente o ano inteiro, servindo de fonte contínua de infecção, mas a maior disponibilidade de larvas ocorre frequentemente no fim do período chuvoso e início da estação seca, época em que ocorrem os surtos de nematodiose (COSTA et al., 2009). Geralmente, as infecções por nematóides gastrointestinais são provocadas por mais de uma espécie que ocorrem simultaneamente no mesmo animal e os sinais clínicos variam de acordo com a idade, imunidade, estado nutricional do hospedeiro, intensidade da carga parasitária e as espécies de nematóides envolvidas na infecção (VLASSOF et al., 2001).

O parasitismo pode provocar sérios danos à saúde do animal. Tais danos se configuram em retardo no desenvolvimento, perda de peso, anemia severa, redução na produção de lã, carne e leite, o que resulta em perda de produtividade, geração de custos com o combate das enfermidades e comprometimento do processo produtivo (PERRY et al., 2002; KRYCHAK-FURTADO et al., 2005). Altas taxas de mortalidade nos rebanhos estão associadas à elevada carga parasitária,

sendo que os animais mal nutridos e os mais jovens são os mais susceptíveis aos efeitos do parasitismo (SANTA ROSA, 1996).

Caprinos e ovinos são acometidos por diversos nematóides, mas os principais gêneros prevalentes nos rebanhos são:

- Abomaso: *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus axei*;
 - Intestino delgado: *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides papillosus*, *Cooperia punctata*, *Cooperia pectinata* e *Bunostomum trigonocephalum*;
 - Intestino grosso: *Oesophagostomum colubianum*, *Trichuris ovis*, *Trichuris globulosa* e *Skrjabinema* sp.
- (VIEIRA, 2005).

Em uma perspectiva global, *H. contortus* é considerado o nematóide gastrointestinal de maior prevalência e patogenicidade para pequenos ruminantes, causando extensas perdas econômicas para o setor de criação de caprinos e ovinos. Pertencente à família Trichostrongylidae, *H. contortus* tem ciclo de vida direto, que pode ser dividido em duas fases: uma de vida livre, no ambiente e outra parasitária (GEORGE, 1998).

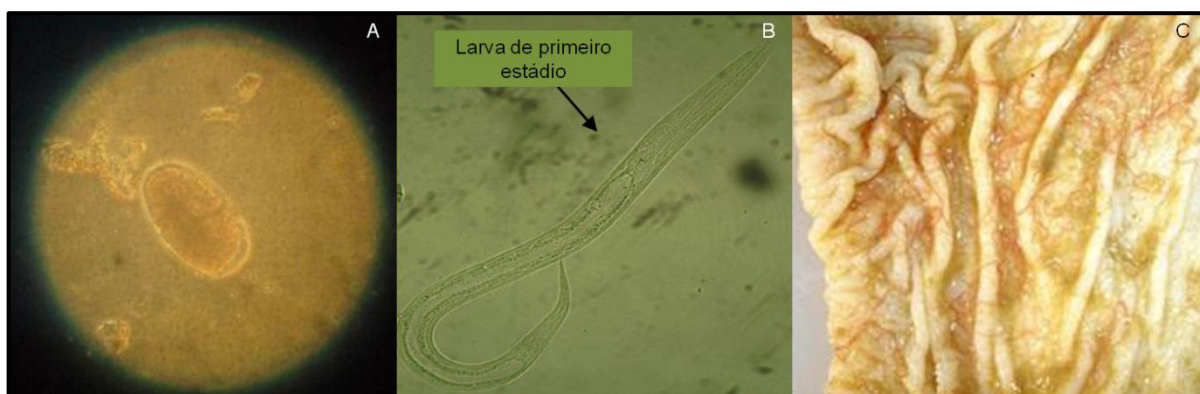


Figura 1. Ovo (A), larva de primeiro estágio (B) e adultos de *Haemonchus contortus* na mucosa do abomaso (C). Fonte: CARVALHO, 2011; OLIVEIRA, 2013; ENDO, et al., 2014.

Fêmeas e machos adultos estão localizados no abomaso do hospedeiro onde realizam a cópula. As fêmeas eliminam os ovos que seguem pelo intestino e são eliminados no ambiente junto com as fezes. As fêmeas são capazes de produzir

milhares de ovos por dia, o que pode provocar uma elevada contaminação da pastagem (LE JAMBRE, 1995).

Nas fezes, os ovos se desenvolvem em estádios larvais subseqüentes denominados de L₁, L₂ e larva infectante de terceiro estágio, L₃. As larvas infectantes migram das fezes e são ingeridas pelos animais junto com o pasto. Ao chegarem ao abomaso, as larvas penetram na mucosa gástrica e realizam a muda para L₄. As larvas L₄ voltam ao lúmen do abomaso onde se fixam na parede gástrica e se desenvolvem em L₅ e adultos, reiniciando o ciclo (CLIMENI et al., 2008) (Figura 2).

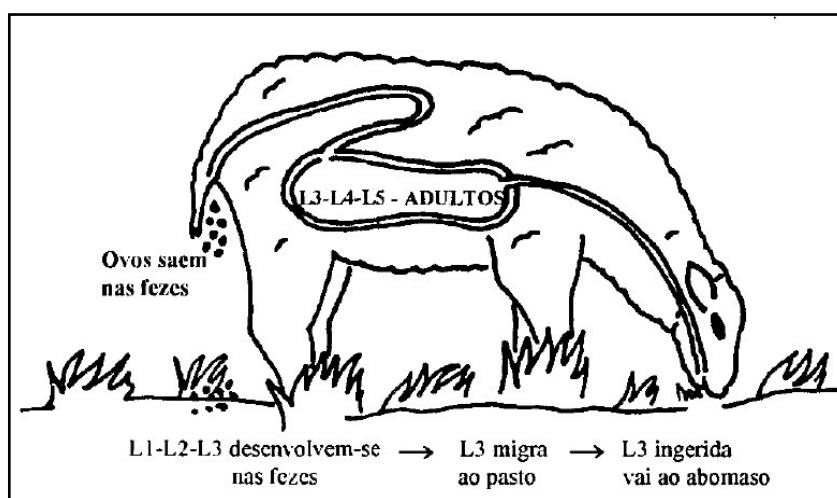


Figura 2. Ciclo biológico do nematóide *Haemonchus contortus* (GIRÃO et al., 1998).

A infecção por *H. contortus* pode provocar a hemoncose, doença de elevada importância veterinária para a pecuária (CLIMENI et al., 2008). Os principais problemas provocados por esse parasito estão relacionados ao seu hábito hematófago. Ao se instalar no abomaso do hospedeiro, cada parasito provoca perda diária de 0,05 mL de sangue pela ingestão e extravasamento das lesões (TAYLOR et al., 2007). Os sinais clínicos da hemoncose mais comumente observados são edema submandibular, progressiva perda de peso, desidratação e anemia, caracterizada pela queda do volume globular (SANTA ROSA, 1996). Em casos mais severos de intensa infestação, a hemoncose pode levar à morte súbita dos animais (CLIMENI et al., 2008).

Para reduzir os danos causados pelo parasitismo, os produtores pecuários realizam controle, em geral, com a administração de medicamentos sintéticos de amplo espectro. As principais classes de anti-helmínticos utilizadas na

produção pecuária são dos grupos químicos das Avermectinas, Milbemicina, Benzimidazóis, Imidazóis, Salicilanidas, utilizados com o objetivo de reduzir os níveis de infecção dos animais e diminuir o grau de contaminação das pastagens (STEAR; MURRAY, 1994; MOLENTO et al., 2004). Girão et al. (1998) preconizam que além da vermifugação dos animais, outras práticas de manejo devem ser adotadas para o controle eficiente dos parasitos, tais como pastejo alternado, descanso da pastagem, evitar altas taxas de lotação, fazer limpeza das instalações e separar animais por faixa etária. Nesse sentido, o manejo nutricional, sanitário e reprodutivo são práticas importantes em toda exploração pecuária para alcançar bons índices de produtividade.

Por ser de resposta rápida, o uso de anti-helmínticos sintéticos tem sido largamente empregado por produtores pecuários. No entanto, o uso excessivo desses produtos tem levado ao surgimento de linhagens de parasitos insensíveis aos princípios ativos dos anti-helmínticos do mercado. Relatos de resistência tem se tornado cada vez mais comum em todo o mundo (GATONGI et al., 2003; THOMAZ-SOCCOL et al., 2004; POMROY, 2006; SISSAY et al., 2006).

Alternativamente, o uso de produtos de origem vegetal tem sido amplamente investigado como forma de controlar parasitos. O uso de plantas medicinais não é em si uma prática nova, mas o interesse da ciência em validar a ação de fitoterápicos tem crescido nos últimos anos (GITHIORI et al., 2006).

A fitoterapia pode ser uma importante aliada no controle estratégico de nematóides gastrointestinais. Com essa perspectiva, Macedo et al. (2013) demonstraram que o óleo essencial das plantas *Alpinia zerumbet*, *Coriandrum sativum* e *Tagetes minuta* exibe eficiência *in vitro* sobre a eclosão de ovos do *H. contortus*, com percentuais de inibição de 81 a 99% a 2,5 mg/mL e inibição do desenvolvimento de larvas variando de 94 a 99% a 10 mg/mL.

A eficácia de extratos das plantas *Ananas comosus* e *Lespedeza cuneata* foi avaliada em testes *in vivo* com um tratamento em duas fases. Os tratamentos consistiram em administrar, por via oral, os extratos a 100 mg/kg de peso corporal uma vez por semana durante 42 dias (fase 1) e depois por três dias consecutivos (fase 2). A eficiência observada foi de 58% e 61%, na fase 1 e 77% e 81%, na fase 2 para as plantas *A. comosus* e *L. cuneata*, respectivamente (AHMED et al., 2014).

Redução de 100% na contagem de ovos fecais durante 21 dias foi observada quando cordeiros infectados com nematóides gastrointestinais (*Haemonchus contortus*, *Cooperia* spp., *Chabertia* spp., *Trichuris* spp., *Trichostrongylus* spp., *Ostertagia* spp e *Nematodirus* spp.) foram tratados com o extrato de *Salix babylonica* (20 mL/codeiro/dia, extrato preparado utilizando 1 g de folha para 8 mL de água) (CEDILLO et al., 2015).

A ação efetiva de extratos vegetais geralmente é atribuída aos compostos do metabolismo secundário das plantas (MOLAN et al., 2003; BARRAU et al., 2005, YONDO et al., 2013), mas alguns trabalhos relatam a eficiência de proteínas vegetais no controle de nematóides gastrointestinais. Por exemplo, proteases obtidas a partir do mamão são eficientes no controle do endoparasito de suínos, *Trichuris suis* (LEVECKE et al., 2014) e do parasito do estômago de ratos, *Protospirura muricola* (STEPEK et al., 2007). Outros aspectos relacionados à utilização de proteínas bioativas para o controle de nematóides gastrointestinais foram abordados no capítulo II.

2.2 Infecções por bactérias patogênicas

As infecções bacterianas são um problema para a produção pecuária porque podem comprometer a produtividade dos rebanhos, além da possibilidade de contaminação dos produtos de origem animal utilizados na alimentação humana. Dessa forma, o controle e a prevenção de doenças infecciosas são práticas indispensáveis para melhorar a eficiência da produção, bem como para a proteção do bem-estar humano e animal (EVANGELOPOULOU et al., 2015).

A principal doença infecciosa do gado leiteiro é a mastite. A mastite é uma inflamação na glândula mamária que pode ser causada por microorganismos, por traumas físicos ou agentes químicos irritantes (LANGONI et al., 1998). Quando é causada por microorganismos, a resposta inflamatória tem a finalidade de regenerar os tecidos danificados, eliminar os agentes infecciosos e neutralizar as toxinas por eles produzidas. Essa doença influencia diretamente na produção de leite, além de ser responsável por alterações nas características físicas, químicas e bacteriológicas do mesmo (SANTOS; FONSECA, 2007). Ressalta-se ainda, a relevância dessa doença em relação à saúde pública, devido ao envolvimento de bactérias

patogênicas que podem colocar em risco à saúde humana (ZECCONI; HAHN, 1999).

Diversos microorganismos podem provocar a mastite, dos quais podemos citar: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium bovis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, espécies dos gêneros *Citrobacter*, *Serratia* e *Proteus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium* e outros *Streptococcus* (HARMON, 1994; RANJAN et al., 2006). Desses, *S. aureus* destaca-se como o agente causador da mastite contagiosa de maior importância, ocorrendo com maior prevalência nos rebanhos leiteiros do mundo todo. *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva, do tipo cocos coagulase positivos, β -hemolíticos, maltose e manitol positivos (JAY, 1994) que cresce prontamente no canal do teto (PHILPOT; NICKERSON, 2000). Essas bactérias secretam toxinas que podem contaminar o leite e permanecer estáveis no produto *in natura* ou nos derivados (FAGUNDES; OLIVEIRA 2004).

Outra doença de elevada importância médico-veterinária é a salmonelose. Essa doença é provocada por bactérias do gênero *Salmonella*, que ao serem ingeridas pelo animal se estabelece no trato gastrointestinal, principalmente no íleo. Morfo-fisiologicamente, salmonelas são bacilos Gram-negativos, aeróbios e aeróbios facultativos, mesófilos, descarboxilase positivos, urease e indol negativos (CAMPOS, 2002). Essas bactérias pertencem à família Enterobacteriaceae que inclui, aproximadamente 2.300 sorotipos, entre os quais 1.367 pertencem à subespécie *enterica* (CAMPOS, 2002). *Salmonella enterica* sorovares Typhimurium, Agona e Enteritidis, ocasionam salmoneloses em diversos animais (LAX et al., 1995), sendo de grande interesse nos últimos anos devido à infecção alimentar ocasionada em humanos (SEO et al., 2000).

Nos animais de produção, o controle de microorganismos patogênicos é feito principalmente pelo uso de antibióticos sintéticos. As principais doenças tratadas com antimicrobianos são as gastroentéricas, respiratórias, cutâneas e reprodutivas (TEUBER, 2001). Durante o tratamento da mastite, é obrigatório o descarte do leite de acordo com o período de carência do antibiótico o que resulta em perdas econômicas para os produtores (BRITO, 2007). Outros problemas relacionados ao uso excessivo de antibióticos estão relacionados à contaminação

ambiental, contaminação residual dos produtos origem animal utilizados na alimentação humana e o fenômeno da resistência bacteriana.

Em meio a esse cenário, o conhecimento sobre espécies vegetais com atividade antimicrobiana tem sido ampliado nos últimos anos com o intuito de desenvolver novas estratégias de controle. Nesse contexto, Pinho et al. (2012) observaram que extratos de várias plantas nativas do Cerrado e Mata Atlântica inibem o crescimento de *S. aureus*, constituindo-se como uma fonte de compostos antibiótico que pode ser aproveitada por produtores locais.

Extratos ou óleos essenciais de plantas exibem efeitos sinérgicos com antibióticos, apresentando-se como uma alternativa potencial para o controle de linhagens resistentes (FAROOQUI et al., 2015; MIKULÁŠOVÁ et al., 2016). Outra descoberta interessante é que a combinação de extratos vegetais de diferentes plantas medicinais também pode apresentar interações potencializadoras da eficácia antimicrobiana. Nesse sentido, Ncube et al. (2012) avaliaram o fitosinergismo de diferentes extratos obtidos de três plantas medicinais e observaram efeito sinérgico, aditivo, indiferente e antagônicos.

Estudando o efeito de extratos vegetais sobre 29 bactérias Gram-negativas incluindo bactérias multirresistentes, Fankam et al. (2015) observaram que os extratos de diferentes plantas eram capazes de inibir o crescimento bacteriano e de potencializar o efeito de antibióticos sobre bactérias multirresistentes, onde o extrato do fruto de *Allanblackia gabonensis* apresentou mínima concentração inibitória (MIC) inferior a 100 µg/mL para 37% das bactérias e o extrato de folhas de *Combretum molle* exerceu efeitos moduladores quando combinado com cloranfenicol, canamicina, estreptomicina e tetraciclina sobre bactérias multirresistentes com percentuais variando de 67% a 100%.

N'guessan et al. (2007) avaliaram o efeito bactericida de extratos aquosos de *Thonningia sanguinea* para cepas de *Salmonella* multirresistentes a droga (MRD) e cepa sensível. Neste estudo os autores obtiveram valores de IC₅₀ para as MRD *S. typhi*, *S. hadar* e *S. typhimurium* de 0,10, 0,45 e 1,25 mg/mL, respectivamente, e 0,25 mg/mL para a sensível *S. enteritidis*.

2.3 *Ficus benjamina*

Ficus é um gênero de plantas laticíferas pertencente à família Moraceae que abrange mais de 1.800 espécies conhecidas, das quais, grande parte é descrita como planta medicinal utilizada para diversos fins, incluindo-se o uso no controle de verminoses (HANSSON et al., 1986; ARAÚJO, 2012) e microorganismos (KUMAR et al., 2013; YESSOUFOU et al., 2015).

Ficus benjamina ou figueira-benjamim, como é popularmente conhecida, é uma planta nativa do sul da Ásia que foi introduzida no Brasil por volta de 1970 e atualmente é amplamente cultivada em todo país para fins ornamentais e de arborização (ARAÚJO, 2012). É uma árvore perenifólia, de 10 a 15 metros de altura com grande copa globosa; folhas simples, coreáceas, ovaladas, ovalado-oblongas ou ovalado-elípticas, com ápice alongado, verde brilhantes; os frutos do tipo sicônios são sésseis, globosos, geralmente dispostos aos pares, axilares, avermelhados quando maduros (LORENZI et al., 2003). A classificação taxonômica da espécie é feita de acordo com a descrição na Figura 3.

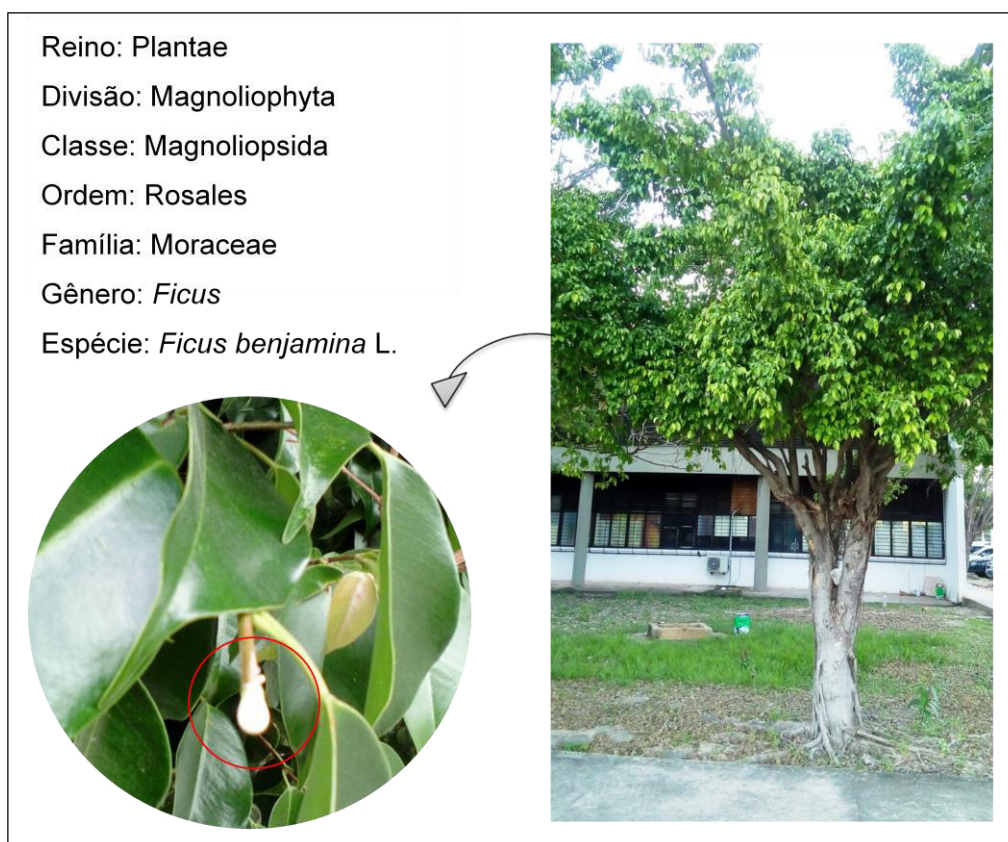


Figura 3. Classificação taxonômica (esquerda) e imagem de um exemplar da espécie *Ficus benjamina* (direita) com detalhe no látex sendo exsudado após incisão do galho (ampliação).

Há relatos da atividade antimicrobiana (RESCHKE et al., 2007), anti-helmíntica (AHMED et al., 2013) e antiviral (YARMOLINSKY et al., 2009) de extratos etanólicos de folhas de *F. benjamina*. Investigando a presença de proteínas da defesa vegetal no látex de *F. benjamina*, Mota (2013) constatou a presença de protease, quitinase, peroxidase e β -1,2-glucanase, além disso, o autor verificou que a fração rica em quitinase foi capaz de inibir 74% do crescimento do fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides*. Esses trabalhos mostram que essa espécie pode ser uma importante fonte de compostos biologicamente ativos, mas são poucos os que avaliam as propriedades biológicas do látex dessa planta (MOTA, 2013).

Nesse contexto, a prospecção de proteínas bioativas para o controle de parasitos e patógenos animais é uma área que tem demonstrado resultados promissores, mas ainda são poucos os trabalhos com essa abordagem.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o potencial anti-helmíntico e antibacteriano de protease do látex de *Ficus benjamina*.

3.2 Específicos

- Obter proteínas do látex de *F. benjamina*;
- Detectar proteases bioativas e estabelecer protocolos de isolamento;
- Identificar a protease;
- Determinar a massa molecular da protease;
- Determinar pH e temperatura ótimos de atividade da enzima.
- Avaliar o potencial da protease e de frações proteicas na inibição do desenvolvimento de larvas do nematóide *Haemonchus contortus*;
- Determinar a concentração responsável por inibir o desenvolvimento de 50% das larvas de *H. contortus* (IC₅₀);
- Avaliar o potencial da protease e frações proteicas na inibição do crescimento das bactérias *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* e *Enterobacter aerogenes*;
- Determinar a concentração mínima da protease que inibe o crescimento (MIC) das bactérias.

CAPÍTULO II – ARTIGO DE REVISÃO

Potencial de proteínas exógenas no controle de nematóides gastrointestinais

Resumo

Nematóides gastrointestinais comprometem a saúde de humanos, animais domésticos e causam elevadas perdas econômicas em animais de produção. Atualmente, o controle desses parasitos é um grande desafio, pois a resistência aos anti-helmínticos sintéticos é uma realidade mundial. Alternativas como a utilização de produtos de origem biológica são relevantes do ponto de vista ambiental e econômico. As proteínas são moléculas com diferentes propriedades biológicas que podem ser obtidas de uma ampla gama de seres vivos. Proteínas pertencentes a diferentes classes têm mostrado elevado potencial no controle de nematóides parasitos de vários gêneros com mecanismo de ação diferente dos medicamentos atuais do mercado, podendo ser uma solução onde há casos de resistência generalizada. Aqui, discutimos a utilização de proteínas e peptídeos exógenos no controle de nematóides parasitos do trato digestório de animais e os possíveis mecanismos de ação, bem como os desafios e perspectivas para o uso dessas biomoléculas como uma nova classe de anti-helmínticos.

Palavras-chave: nematicida, protease, quitinase, lectina, Cry, peptídeos.

1. Introdução

O parasitismo por nematóides gastrointestinais é um problema de saúde mundial para humanos e animais. Na pecuária, as doenças parasitárias constituem-se um dos maiores entraves para a produção animal de forma a comprometer diretamente a produtividade dos rebanhos e proporcionam elevadas perdas econômicas (Waller, 2003; Nieuwhof e Bishop, 2005; Grisi et al., 2014).

Para reduzir os prejuízos e para garantir a produtividade e viabilidade da produção, é necessário o controle eficiente dos parasitos com tratamentos sobre o hospedeiro e também com um conjunto de práticas de manejo que necessitam do conhecimento prévio da biologia do parasito (Sayers e Sweeney, 2005).

Produtos de origem natural já foram muito utilizados pelo homem para a cura de diversas doenças (De Pasquale, 1984). Porém, com o surgimento de novas técnicas de obtenção de fármacos sintéticos e a necessidade do controle de muitas doenças, incluindo as parasitoses, o uso de produtos químicos sintéticos passou a ser preferencialmente o método de controle dos parasitos em substituição aos produtos de origem natural (Cezar et al., 2008). Entretanto, sabe-se que o uso indiscriminado desses produtos provoca contaminação ambiental além da seleção de linhagens de parasitos resistentes, fenômeno cada vez mais comum em todo o mundo (Gopal et al., 1999; Nabukenya et al., 2014; Geurden et al., 2015). Em meio a esse cenário, há uma necessidade contínua da busca por novas moléculas e alternativas para controle de parasitos que sejam eficazes e ao mesmo tempo menos danosas ao meio ambiente. É neste contexto que os produtos de origem natural são relevantes.

Atualmente, há um crescente avanço na prospecção de biomoléculas para o controle de diversos parasitos com maior avanço na área que investiga compostos de origem vegetal, e os resultados são bastante satisfatórios. Entretanto, na maioria dos estudos realizados, a ação é geralmente atribuída aos compostos do metabolismo secundário das plantas (Oliveira et al., 2011).

Recentemente, as proteínas têm se destacado como moléculas promissoras por apresentarem grande potencial farmacológico e biotecnológico (Dimitrov, 2012). Entretanto, são ainda pouco exploradas contra parasitos animais, incluindo os nematóides gastrointestinais. Assim, esta revisão tem por objetivo discutir sobre a utilização de proteínas como uma ferramenta alternativa potencial no controle de nematóides parasitos que acometem o trato digestório de animais, bem como os possíveis mecanismos de ação.

2. Proteínas com potencial farmacológico

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nos seres vivos. Essas biomoléculas desempenham diversas funções, incluindo estruturação, regulação do metabolismo e defesa do organismo (Nelson e Cox, 2006).

As plantas possuem um grupo de proteínas denominadas proteínas relacionadas à patogênese (RP-proteínas) que são responsáveis pela defesa, direta ou indireta, ao ataque de patógenos, parasitos e herbívoros. Essas proteínas são eficientes no controle dos inimigos naturais das plantas. Proteínas como protease, lipase, collagenase são capazes de provocar efeitos danosos na estrutura cuticular de fitonematóides levando-os à morte, como foi observado com o fitonematóide *Tylenchorhynchus dubius* ou causar diminuição na motilidade como foi observado para os fitonematóides *Hoplolaimus tylenchiformis* e *Pratylenchus penetrans* (Miller e Sands, 1977).

A eficácia das RP-proteínas sobre os inimigos naturais das plantas já é bastante conhecida, mas tem-se comprovado que as RP-proteínas também podem ser eficientes no controle de parasitos e patógenos de outros seres vivos. Estas proteínas vêm sendo purificadas e testadas como potenciais no desenvolvimento de produtos contra fungos de importância médica (Klafke et al., 2013), vírus (HIV) (Lam e Ng, 2009) e contra doenças como o câncer (Silva et al., 2014).

Proteínas de plantas também são promissoras no controle de parasitos animais. Lectinas de *Gracilaria cornea* e do látex de *Synadenium carinatum* possuem ação carrapaticida e leishmanicida, respectivamente (Lima et al., 2005; Afonso-Cardoso et al., 2011). Adicionalmente, foi verificada ação antimalarial de um inibidor de protease purificado das sementes de *Derris trifoliata* (Bhattacharyya e Babu, 2009).

Bactérias e fungos também podem ser fontes de proteínas bioativas. As enzimas produzidas por organismos nematófagos como quitinases, collagenases, lipases e proteases são cruciais no processo de infecção do hospedeiro. Essas enzimas são responsáveis pela desestabilização física e fisiológica da cutícula dos nematóides podendo interferir no ciclo de vida e/ou causar a morte (Tikhonov et al., 2002). Extratos brutos enzimáticos do fungo nematófago *Arthrobotrys sinensis* assim como uma protease serínica do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium*

possuem ação anti-helmíntica sobre o nematóide *Angiostrongylus vasorum*, um parasito cardiopulmonar de cães (Soares et al., 2012; Soares et al 2014).

Esses estudos corroboram com o fato de que proteínas podem ser utilizadas no controle de organismos patogênicos. Entretanto, quando se pensa no uso dessas moléculas contra nematóides gastrointestinais um aspecto importante a ser considerado é a formulação e a forma de administração. A escolha dos métodos ideais de administração e formulação é um grande desafio para a utilização de proteínas como uma nova classe de anti-helmínticos, pois deve levar em consideração: 1) as características físico-químicas da proteína; 2) o local de residência do parasito; 3) o mecanismo de ação da proteína bioativa. Apesar das dificuldades inerentes à administração de fármacos proteicos, são crescentes os avanços biotecnológicos e diversos peptídeos e proteínas são alvo de estudos, incluindo pesquisas direcionadas a administração oral, para o desenvolvimento de drogas (Morishita e Peppas, 2006).

3. Proteínas no controle de nematóides gastrointestinais

O látex de plantas tradicionalmente tem sido utilizado para o tratamento de infecções parasitárias em seres humanos (Hansson et al., 1986) e animais (Caldwell e Caldwell, 1929; Satrija et al., 1994), mas um dos primeiros relatos da natureza proteica da atividade anti-helmíntica foi feito por Robbins (1930), que deu o nome de ficina à protease cisteínica obtida de *Ficus* spp. capaz de degradar a cutícula de *Ascaris suum*. Ação semelhante foi observada quando *A. suum* foi tratado com bromelina (do suco de *Ananas comosus*) (Berger e Ansejo, 1939) e papaína cristalina pura de *Carica papaya* (Berger e Ansejo, 1940), tanto a bromelina quanto a papaína agiram rapidamente provocando ulcerações na cutícula do nematóide seguida de digestão.

Em 1990, Lopez-Llorca purificou uma protease serínica obtida do fungo *Pochonia rubescens* capaz de degradar proteínas de cisto de nematóide, sugerindo o seu papel no processo de infecção. Posteriormente, muitas outras enzimas de microrganismos nematófagos foram identificadas como fator de virulência no processo de infecção (Yang et al., 2013). Estudos mais recentes estão sugerindo a importância dessas enzimas no antagonismo com nematóides gastrointestinais nos

estádios de vida livre. O extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* provoca alterações morfológicas em ovos de *Ancylostoma* sp. e proporciona redução de 76,8% no percentual de eclosão dos ovos (Braga et al., 2011).

A natureza proteica da atividade ovicida sobre ovos do *Haemonchus contortus* tem sido recentemente sugerida (Salles et al., 2014; Soares et al., 2015) indicando um novo direcionamento para pesquisas visando o desenvolvimento de novos produtos anti-helmínticos. A ação destas proteínas pode ocorrer em estádios específicos do ciclo de vida do nematóide, visto que não foi relatado efeito larvicida das proteínas testadas contra *H. contortus* (Soares et al., 2015).

Esses estudos sugerem que as enzimas agem na cutícula e membrana dos ovos dos nematóides. A cutícula é um revestimento externo essencial para o crescimento, locomoção e sobrevivência dos nematóides. Essa estrutura pode diferir entre espécies ou mesmo entre as fases de vida de uma mesma espécie, no entanto, apresenta uma forma estrutural básica constituída essencialmente de proteínas com pequena quantidade de lipídios e carboidratos. Possui estratos de constituição diferenciada: estrato basal e medial, formado por colágeno; região epicuticular e cortical externa, constituídas de outros tipos de proteínas não colágenas; e proteínas não estruturais associadas à superfície externa como glicoproteínas (Bird e Bird, 1991; Fettere e Rhoads, 1993). A membrana do ovo também é formada por diferentes camadas: camada basal, constituída de lipídios e proteínas; camada medial quitinosa; e camada externa vitelínica (Mansfield et al., 1992). Dessa forma, a cutícula e a membrana do ovo podem ser alvos para o ataque de proteínas como proteases, lectinas, quitinases, lipases e collagenases.

A tabela 1 traz um resumo das proteínas e peptídeos citados nesta revisão com os nematóides gastrointestinais sobre os quais eles apresentam atividade. Os mecanismos de ação propostos para cada classe de proteína estão descritos nas subseções.

Tabela 1: Proteínas e peptídeos com ação sobre nematóides gastrointestinais que habitam nas diferentes regiões do trato digestório de animais

Proteína/peptídeo	Origem	Parasito	Habitat	Referência
Protease cisteínica	Vegetal	<i>Ascaris suum</i>	Intestino delgado	Robbins, 1930; Berger e Ansejo, 1939; Berger e Ansejo, 1940
Protease cisteínica	Vegetal	<i>Trichuris suis</i>	Intestino grosso	Leveck et al., 2014
Protease cisteínica	Vegetal	<i>Heligmosomoides bakeri</i>	Intestino delgado	Stepeck et al., 2007b
Protease cisteínica	Vegetal	<i>Trichuris muris</i>	Intestino grosso	Stepeck et al., 2006
Protease cisteínica	Vegetal	<i>Protospirula muricola</i>	Estômago	Stepeck et al., 2007a
Protease serínica	Fúngica	<i>Haemonchus contortus</i>	Abomaso	Junwei et al., 2013
Lectina	Vegetal e Fúngica	<i>Haemonchus contortus</i>	Abomaso	Rios-de-Álvarez et al., 2012a; Heim et al., 2015
Lectina	Vegetal	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Abomaso	Rios-de-Álvarez et al., 2012a; Rios-de-Álvarez et al., 2012b
Lectina	Vegetal	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Intestino delgado	Rios-de-Álvarez et al., 2012a; Rios-de-Álvarez et al., 2012b
Lectina	Vegetal	<i>Strongyloides ratti</i>	Intestino delgado	Tobata-Kudo et al., 2005
Quitinase	Fúngica	<i>Strongyloides westeri</i>	Intestino delgado	Braga et al., 2014
Cry	Bacteriana	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	Intestino delgado	Wei et al., 2003
Cry	Bacteriana	<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	Intestino delgado	Capello et al., 2006
Cry	Bacteriana	<i>Heligmosomoides bakeri</i>	Intestino delgado	Hu et al., 2010
Cry	Bacteriana	<i>Ascaris suum</i>	Intestino delgado	Urban et al., 2013
Ciclotídeo	Vegetal	<i>Haemonchus contortus</i>	Abomaso	Colgrave et al., 2008a; Colgrave et al., 2008b
Ciclotídeo	Vegetal	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Intestino delgado	Colgrave et al., 2008a; Colgrave et al., 2008b

3.1. Proteases

Proteases são enzimas hidrolíticas que clivam ligações peptídicas. Esse grupo de proteínas ocorre em todos os seres vivos e faz parte de diversos processos

celulares como vias metabólicas e de sinalização celular. De acordo com o grupo químico do sítio ativo envolvido no mecanismo catalítico as proteases podem ser classificadas em cisteíno, serino, aspártico, treonina ou metalo-proteases. Quanto ao pH ótimo de atividade, as proteases podem ser classificadas em ácidas (pH de 2,0 a 6,0), neutras (pH de 6,0 a 8,0) e alcalinas (pH de 8,0 a 13,0) (Felix, Noronha, Marco, 2004). Algumas proteases requerem componentes químicos adicionais para serem ativas, tais como íons metálicos ou moléculas orgânicas complexas denominadas de coenzimas.

Proteases cisteínicas produzidas pelas plantas têm papel crucial, não só na regulação do metabolismo, mas principalmente na defesa da planta com ação direta sobre herbívoros, patógenos e nematóides (Pechan et al., 2000). Acredita-se que os nematóides gastrointestinais em estágio parasitário não expressam defesas contra proteases cisteínicas, já que mamíferos não secretam essas enzimas no trato digestório (Behnke et al., 2008). Assim, as proteases cisteínicas passaram a ser alvo de investigação em ensaios biológicos com nematóides parasitos de animais.

Proteases cisteínicas do látex de mamão são eficientes no controle da infecção por *Trichuris suis* em suínos com baixos (inoculação de 300 ovos) e altos níveis (inoculação de 3.000 ovos) de infecção. A dose única de 450 μ mol de protease proporcionou a eficácia maior que a dose única de albendazol 400 mg. Os animais apresentaram redução na contagem de ovos e redução de vermes, com eficiência superior a 97% (Levecke et al., 2014).

A ação anti-helmíntica de proteases cisteínicas foi avaliada para parasitos que habitam as diferentes regiões do trato digestório em estudos utilizando nematóides parasitos de pequenos roedores como modelo. Em testes *in vivo*, proteases cisteínicas de várias plantas mostraram-se potentes no controle dos nematóides *Heligmosomoides bakeri* (parasito do intestino delgado) e *Trichuris muris* (parasito do intestino grosso), o que indica que as proteases permaneceram ativas e resistentes à hidrólise durante a passagem de quase todo o trato gastrointestinal. Entretanto, a ação anti-helmíntica contra *Protospirura muricola* (parasito do estômago) foi observada somente quando a acidez do estômago do hospedeiro foi neutralizada antes da administração das proteases, indicando que enzimas podem ser eficientes quando administradas da forma apropriada (Steppek et al., 2006; Steppek et al., 2007a; Steppek et al., 2007b).

A atividade nematocida sobre *H. bakeri*, *T. muris* e *P. muricola* também foi verificada em testes *in vitro* e o mecanismo de ação das proteases foi proposto. Tanto o extrato bruto quanto as enzimas purificadas do látex de mamão (*C. papaya*), figo (*Ficus carica* e *Ficus benjamina*), abacaxi (*A. comosus*) e *Asclepias sinaica* mostraram eficiência contra fêmeas e machos adultos do nematóide *H. bakeri*. As proteases purificadas apresentaram maior eficiência que os extratos brutos e a ação anti-helmíntica dos extratos brutos foi completamente inibida por um inibidor de protease cisteínica (E-64) (Stepek et al., 2005). Adicionalmente, foi observado que a ação da papaína sobre *H. bakeri* é independente do sexo do hospedeiro e da intensidade da carga parasitária (Louga et al., 2015). Os mesmos extratos brutos que mostraram eficiência sobre *H. bakeri* também são ativos contra *T. muris* e *P. muricola*. Os autores sugerem que proteases cisteínicas reduzem acentuadamente a motilidade de tais nematóides por atacarem a cutícula, deixando-a enfraquecida o suficiente para que a pressão hidrostática interna do corpo desintegre os parasitos (Stepek et al., 2006; Stepek et al., 2007a). No entanto, nem todas as proteases cisteínicas atuam de modo semelhante, pois, a actinidain, uma protease obtida a partir do suco do fruto de *Actinidia chinensis* não proporcionou nenhum dano sobre a cutícula dos nematóides.

Estudos também relatam à ação de proteases serínicas, especialmente as obtidas de microorganismos nematófagos. Uma protease serínica semelhante à subtilina do fungo *Arthrobotrys oligospora* (produzida em sistema heterólogo por *Pichia pastoris*) possui ação anti-helmíntica sobre *H. contortus*. A proteína recombinante é capaz de provocar imobilização e degradação da cutícula induzindo o nematóide à morte (Junwei et al., 2013).

O fungo *Duddingtonia flagrans* produz uma protease serínica capaz de reduzir em 58% o percentual de larvas de terceiro estágio (L₃) de ciatostomíneos (Nematoda-Cyathostominae) (Braga et al., 2012). Entretanto, acredita-se que os nematóides possuam defesas contra essa classe de protease uma vez que são abundantemente encontradas no intestino de mamíferos (Zang e Maizels, 2001).

As collagenases são outro grupo de proteases que apresentam propriedade biológica relevantes para o estudo no antagonismo contra nematóides gastrointestinais. Collagenases são proteases que catalisam a hidrólise do colágeno que é o principal constituinte da cutícula de nematóides. No entanto, em nossa

pesquisa bibliográfica não encontramos relatos sobre a aplicação dessas enzimas no controle de nematóides gastrointestinais.

3.2. Quitinases

A quitina é uma molécula rígida que forma estruturas protetoras, de suporte e defesa nos organismos onde ela é encontrada. É o principal constituinte da membrana dos ovos de nematóides e forma, junto com proteínas, uma estrutura microfibrilar amorfa (Wharton, 1980). Quitinases são enzimas glicosídeo hidrolases que clivam as ligações β -[1-4] entre os monômeros que formam a quitina, N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina. Essas enzimas são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em diversos seres vivos onde desempenham papéis nutricionais, defensivos, parasitários e morfogênicos. Nas plantas as quitinases são produzidas, principalmente para defesa de inimigos naturais. No entanto, recentemente, quitinases vegetais também foram relacionadas com atividade anti-helmíntica sobre ovos de nematóides gastrointestinais. Ovos de *H. contortus* tratados com extratos protéicos ricos em quitinase apresentaram significativa redução no percentual de eclosão (Soares et al., 2015).

Já é bastante conhecido que quitinases exercem um papel essencial na capacidade nematicida de fungos (Tikhonov et al., 2002). O tratamento de ovos de nematóides com quitinase provoca a formação de grandes vacúolos na camada de quitina e perda da integridade na camada vitelínica. No entanto, sobre a eclodibilidade, quitinases podem exercer efeitos diferentes a depender da origem. Khan et al. (2004) verificaram que o tratamento de ovos com quitinase fúngica reduz a eclosão enquanto que uma quitinase bacteriana exerceu efeitos contrários, isto é, aumentou o percentual de eclosão dos ovos do fitonematóide *Meloidogyne javanica*. Adicionalmente, quitinases produzidas pelos fungos nematófagos *D. flagrans* e *P. chlamydosporia* foram demonstradas com propriedades anti-helmínticas sobre larvas de *Strongyloides westeri*, um nematóide parasito do intestino delgado de cavalos (Braga et al., 2014).

3.3. Lectinas

Lectinas são proteínas com domínio não catalítico capaz de reconhecimento/ligação (específica e reversível) a mono ou oligossacarídeos (Lam e Ng, 2011). Estudos estão sugerindo que essas características são responsáveis pela propriedade nematicida desse grupo de proteínas, isto é, a toxicidade das lectinas está relacionada com a ligação da proteína com glicanos específicos nos organismos alvo (Butschi et al., 2010). Em *Caenorhabditis elegans*, a ligação à glicanos na superfície do epitélio intestinal provoca a inibição do desenvolvimento larvar podendo levar à morte do nematóide (Butschi et al., 2010). Estruturas de glicanos do nematóide de vida livre, *C. elegans*, mostram ser análogas às do nematóide parasito gastrointestinal, *H. contortus* (Paschinger e Wilson, 2015).

Em estudos realizados por Heim et al. (2015) foi observado que o desenvolvimento de larvas de *H. contortus* na presença de pequenas quantidades de lectinas fúngicas mostra-se ser significativamente prejudicado e análises por microscopia de fluorescência revelaram que somente as quatro lectinas tóxicas foram capazes de ligar-se ao intestino das larvas e de interação com glicanos do tecido gastrodermal de adultos.

Lectinas (fitoemaglutinina E3L, aglutinina de gérmen de trigo e concanavalina A) inibem a alimentação larvar dos nematóides gastrintestinais de ovinos e caprinos *Teladorsagia circumcincta*, *H. contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* (Rios-de-Álvarez et al., 2012a). Muito embora o mecanismo de ação das lectinas não tenha sido bem esclarecido neste estudo, os autores observaram que a aglutinina do gérmen de trigo causa danos na cutícula de *T. circumcincta*. Estudos anteriores indicaram que as lectinas concavalina A, aglutinina de soja e aglutinina de gérmen de trigo promovem inibição na migração de larvas de *Strongyloides ratti* por se ligarem a sensores químicos ao redor da boca ou de sensilas labiais internas do nematóide (Tobata-Kudo et al., 2005).

Lectinas de plantas administradas por via oral em ovinos infectados com os nematóides *T. circumcincta* e *T. colubriformis* reduzem o percentual de ovos nas fezes (Rios-de-Álvarez et al., 2012b). Os autores sugerem ação direta da lectina sobre os parasitos pela redução da fertilidade ou ação indireta por estímulo ao sistema imune, visto que, animais infectados e suplementados com a lectina

apresentaram maior número de eosinófilos e tendência para o aumento de células T auxiliares em comparação com animais infectados, mas que não receberam a lectina na alimentação.

Adicionalmente, a lectina do corpo de frutificação do fungo *Marasmius oreades* (MOA) apresenta um domínio com função enzimática dependente de Ca^{++} . A atividade nematocida de MOA depende da ligação da lectina a glicosfingolipídios, mas a atividade proteolítica tem papel fundamental na toxicidade mediada por MOA (Wohlschlager et al., 2011).

3.4. Proteínas Cry

Proteínas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*, que é uma bactéria já utilizada como inseticida por agricultores orgânicos, passaram a ser investigadas como alternativa para o controle de nematóides com resultados bastante satisfatórios e promissores. Essas proteínas são acumuladas pela bactéria durante a esporulação, na forma inclusões cristalinas, por isso, foram agrupadas em uma família denominada proteínas cristal (Cry) (Maagda et al., 2001).

As proteínas Cry mostram-se bastante eficientes contra insetos, nematóides de vida livre e parasitos de plantas (Wei et al., 2003). Essas proteínas têm uma grande vantagem por não apresentarem toxicidade para vertebrados, o que denota a possibilidade de utilização em programas de controle de nematóides gastrointestinais (Maagda et al., 2001).

Em testes *in vitro*, *Escherichia coli* expressando as proteínas Cry5B, Cry14A e Cry21A são altamente tóxicas para larvas do nematóide gastrointestinal *Nippostrongylus brasiliensis* (Wei et al., 2003). Também foi demonstrado que duas estirpes de *B. thuringiensis* produzem esporos cristais com elevada toxicidade sobre estádios larvais e adultos dos nematóides gastrointestinais *H. contortus*, *T. colubriformis* e *Ostertagia circumcincta* (Kotze et al., 2005).

Em ensaios de toxicidade *in vivo* contra nematóides gastrointestinais, a proteína purificada Cry5B administrada ao longo de três dias em animais infectados com *Ancylostoma ceylanicum*, levou a resultados semelhantes aos obtidos de animais tratados com mebendazol (Capello et al., 2006). A proteína Cry5B também foi avaliada como dose única em infecções por *H. bakeri* e foi capaz de proporcionar

redução de 98% na produção de ovos e redução de 70% na carga parasitária quando administrado por via oral na dose de 700 nmoles/kg (90–100 mg.kg⁻¹) (Hu et al., 2010a). O parasito *A. suum* também expressa receptores para a proteína Cry5B. A proteína é capaz de intoxicar larvas e adultos sendo capaz de proporcionar a eliminação quase completa (97%) dos parasitos com duas doses de 143 nM por kg de peso corporal (Urban et al., 2013).

O mecanismo de ação das proteínas Cry ainda não está completamente esclarecido para nematóides, mas sabe-se que esse grupo de proteína provoca dano tecidual no intestino, diminuição da fertilidade e morte em *C. elegans*, sintomas muito semelhantes aos observados para os insetos. Assim, acreditava-se que o mecanismo de ação fosse análogo, isto é, pela ligação da proteína a glicolipídeos na membrana da célula intestinal e formação de poros que promovem a desestabilização do gradiente osmótico (Marroquin et al., 2000; Wei et al., 2003, Hui et al., 2012). As proteínas Cry têm mostrado elevada especificidade por glicolipídeos receptores específicos de invertebrados (Griffitts et al., 2003). Curiosamente, nematóides mutantes resistentes à proteína Cry5Ba são sensíveis à Cry6Aa, isso pode ser indício de que essas proteínas podem utilizar diferentes vias de toxicidade (Marroquin et al., 2000, Griffitts et al., 2003). A via de necrose que provoca aumento da concentração de cálcio citoplasmático, lise lisossomal, e captação de iodeto de propídio, induzida por Cry6A e mediada por protease aspártica não é ativada por Cry5Ba, além disso, mutantes da via necrótica acima citada mostraram tolerância à Cry6A, mas não à Cry5Ba, o que reforça ainda mais a hipótese (Zhang et al., 2016).

As proteínas Cry podem agir isoladamente, mas podem apresentar efeitos sinérgicos ou até mesmo ter a capacidade nematicida aprimorada pela ação combinada com outras proteínas. Por exemplo, *B. thuringiensis* (strain YBT-1518) produz uma metaloprotease (Bmp1) que aumenta 7,9 vezes a toxicidade da proteína Cry5Ba sobre *C. elegans*. Foi verificado que Bmp1 estava presente ao redor da boca, no esôfago e em maior quantidade no intestino. Bmp1 degrada tecidos do intestino do nematóide facilitando a penetração da Cry5Ba na cavidade entérica onde a proteína Cry exerce toxicidade (Luo et al., 2013). As protoxinas Cry21Fa1 e Cry21Ha1 são letais individualmente, mas mostram sinergismo na capacidade nematicida (Iatsenko et al., 2014). Outra descoberta importante foi a de que a proteína Cry5B possui um forte sinergismo com agonistas de receptores nicóticos de

acetilcolina (pyrantel, levamisol e tribendimidine) que são utilizados no tratamento de infecções parasitárias, assim, essa combinação pode ser empregada no tratamento de cepas resistentes ou para o aumento da eficácia dos anti-helmínticos (Hu et al., 2010b)

Embora essas proteínas possam exercer efeitos sobre componentes da cutícula, acredita-se que o principal alvo das proteínas nematicidas produzidas por *B. thuringiensis* são as proteínas intestinais dos nematóides (Yang et al., 2013).

3.5. Peptídeos

Peptídeos são cadeias curtas de aminoácidos que estão envolvidos em um grande número de processos fisiológicos nos seres vivos. Essas moléculas já são largamente utilizadas como fármacos terapêuticos para o tratamento de doenças fisiológicas como diabetes, osteoporose, Alzheimer, e, atualmente, têm se destacado como potenciais para terapias contra o câncer (Lien e Lowman, 2003).

Naturalmente, os seres vivos são capazes de produzir um grande número de peptídeos antimicrobianos que são, reconhecidamente, capazes de matar vários tipos de microorganismos, constituindo-se a primeira linha de defesa contra infecções (Papagianni, 2003). Mas, também, tem-se sugerido que as plantas produzem peptídeos com atividade biocida contra insetos e fitonematóides (Liu et al., 2011). Dois peptídeos antimicrobianos, piceain 1 e 2, obtidos da planta *Picea sitchensis* exercem forte atividade nematicida sobre o nematóide de vida livre *C. elegans* em baixas concentrações (10 µg/mL) (Liu et al., 2011).

Os peptídeos de natureza cíclica, chamados ciclotídeos, têm se destacado como moléculas promissoras no controle de diversos microorganismos, mas também no controle de nematóides gastrointestinais nos diferentes estádios de vida. O ciclopeptídeo kalata B1 e variantes naturais obtidos da planta *Oldenlandia affinis* foram capazes de interferir nos diferentes estádios de vida (ovo, larva e adulto) dos nematóides gastrointestinais *H. contortus* e *T. colubriformis*. Neste estudo os autores verificaram que mutantes alanina de kalata B1 apresentaram redução na atividade anti-helmíntica enquanto que estereoisômeros mostraram atividades semelhantes (Colgrave et al., 2008a). No entanto, variantes naturais de cycloviolacin (O2, O3, O8, O13, O14, O15 E O16) obtidos da planta *Viola odorata* podem ser até 18 vezes

mais potentes contra larvas em comparação a kalata B1, e também mostra superioridade significativamente maior contra adultos com atividade comparável a alguns anti-helmínticos comerciais (Colgrave et al., 2008b).

Acredita-se que o mecanismo de ação dos ciclotídeos está relacionado com a interação e lise da membrana celular em vez de receptores específicos (Colgrave et al., 2008).

4. Formulação e administração oral de fármacos proteicos

A atividade de uma proteína é estritamente dependente da sua estrutura físico-química. Agentes externos como temperatura, pH, alguns metais e agentes oxidantes e desnaturantes podem causar instabilidade física e/ou química da estrutura proteica de modo reversível ou irreversível, este último provoca perda de função (Nelson e Cox, 2006). Outro fator importante quando se pensa na utilização de proteínas como anti-helmíntico refere-se à degradação pelas abundantes proteases do trato gastrointestinal. Assim, a estabilidade e a proteção à degradação da molécula proteica é um fator de extrema relevância a ser considerado, pois determina a viabilidade de produção de anti-helmínticos proteicos. Nesse contexto, a formulação é um passo crucial no desenvolvimento de drogas proteicas para entrega oral, pois tem como objetivo a proteção e promoção de maior disponibilidade do princípio ativo.

Muito do que já se sabe sobre formulação e entrega de drogas proteicas é proveniente de estudos com proteínas terapêuticas utilizadas no tratamento de doenças fisiológicas humanas. Atualmente existem vários medicamentos à base de proteína no mercado farmacêutico e diferentes estratégias e formulações para proteção de moléculas tais como: emulsão que protege a molécula da acidez e das proteases intestinais e aumenta a permeabilidade da mucosa intestinal; microesferas impedem a degradação proteolítica estomacal e da porção superior do intestino delgado, além de restringir a liberação em áreas favoráveis do trato gastrointestinal; lipossomas melhoram a estabilidade física e aumentam a permeabilidade da membrana celular e nanopartículas previnem a degradação enzimática e aumentam a absorção do epitélio intestinal. Além dos veículos de formulação, outras abordagens como hidrofobização, modificação de aminoácidos, promotores de

absorção, sistema polimérico mucoadesivo podem promover a proteção, estabilidade e absorção da molécula proteica e permitir que ela chegue ao local de interesse (Shaji e Patole, 2008; Dimitrov, 2012).

A incorporação de proteínas em matriz de alginato e quitosana é um método de encapsulamento de proteína que tem mostrado resultados positivos na proteção dessas biomoléculas (George e Abraham, 2006). Utilizando o peixe *Sparus aurata* e a proteína albumina sérica bovina (BSA) como modelos, Sáez et al. (2015) observaram que a combinação de alginato e quitosana proporcionou proteção da BSA aos efeitos de enzimas proteolíticas e maior liberação da proteína no lúmen intestinal do peixe, indicando a eficiência do encapsulamento.

Recentemente, foi proposto um modelo de entrega oral da proteína nematocida Cry5B, utilizando a bactéria *Lactococcus lactis* como um promissor veículo para o tratamento de infecções por nematóides gastrointestinais em mamíferos (Durmaz et al., 2016). Nesse sentido, é possível notar que além da pesquisa basal de prospecção, muitos trabalhos foram feitos na tentativa de elucidar o mecanismo de ação envolvido na capacidade anti-helmíntica de proteínas e que algum esforço está sendo feito no intento de tornar a utilização de medicamentos proteicos, para essa finalidade, uma realidade viável.

O segmento de proteínas terapêuticas é um dos que mais cresce dentro do mercado farmacêutico e o seu estudo passa por várias gerações de desenvolvimento, a fim de se alcançar produtos cada vez mais viáveis, do ponto de vista comercial. Dentre as vantagens comerciais destas proteínas, pode-se mencionar: simplicidade de produção a custos relativamente baixos; riscos reduzidos de efeitos colaterais e elevada biodisponibilidade (Martin, 2006).

5. Considerações finais

Muitas pesquisas estão sendo conduzidas na tentativa de encontrar novas alternativas para o controle de nematóides gastrointestinais em meio a um cenário de resistência dos parasitos aos anti-helmínticos sintéticos comerciais. Até agora, muitos estudos forneceram evidências de que proteínas apresentam potencial para utilização como parte de um programa de controle de nematóides gastrointestinais. No entanto, para que proteínas possam ser utilizadas como uma nova classe de

anti-helmínticos é necessário maior aprofundamento nos estudos, realização de testes sistematizados e formulações apropriadas levando-se em consideração as particularidades de cada região do trato digestório. Apesar de já existirem muitas técnicas de formulação de medicamentos à base de proteína e a possibilidade de obtenção de proteínas em escala industrial, pela técnica de DNA recombinante, a maioria dos estudos está voltada para o tratamento de doenças humanas.

Identificamos trabalhos com testes *in vivo* que realizavam a administração direta das proteínas por via oral em animais infectados. No entanto, a aplicação direta sem proteção da molécula pode incorrer em alguns problemas devido às condições adversas do trato digestório, tais como intensa proteólise e baixo pH do estômago, condições não suportadas por alguns tipos de proteínas (Banga e Chien, 1988). Embora a entrega direta da molécula não seja a melhor solução, nesta revisão são relatados resultados positivos.

Dentro do contexto atual, a utilização de preparações enriquecidas com proteínas que apresentam propriedades nematicidas administradas na forma de aditivos alimentares pode ser uma solução viável para uso em campo (Behnke et al., 2008). As proteínas aqui relatadas apresentam mecanismo de ação diferenciado dos demais produtos do mercado, assim, essas moléculas poderiam ser utilizadas para o tratamento de cepas resistentes aos atuais medicamentos disponíveis comercialmente (Urban et al., 2013).

Referências

- Afonso-Cardoso, S.R., Silva, C.V., Ferreira, M.S., Souza, M.A., 2011. Effect of the *Synadenium carinatum* latex lectin (SCLL) on *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection in murine macrophages. *Exp. Parasitol.* 128, 61-67.
- Banga, A.K., Chien, Y.W., 1988. Systemic delivery of therapeutic peptides and proteins. *Int. J. Pharm.* 48: 15-50.
- Behnke, J.M., David, J., Buttle, D.J., Stepek, G., Lowe, A., Duce, I.R., 2008. Developing novel anthelmintics from plant cysteine proteinases. *Parasit. Vectors* 1, 29.
- Berger, J., Asenjo, C.F., 1939. Anthelmintic activity of fresh pineapple juice. *Science* 90, 299-300.

- Berger, J., Asenjo, C.F., 1940. Anthelmintic activity of crystalline papain. *Science* 91, 387-388.
- Bhattacharyya, A., Babu, C.R., 2009. Purification and biochemical characterization of a serine proteinase inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. Seeds: insight into structural and antimalarial features. *Phytochemistry* 70, 703-712.
- Bird, A.F., Bird, J., 1991. *The Structure of Nematodes*. San Diego: Academic Press.
- Braga, F.R., Araújo, J.V., Soares, R.E.F., Geniêr, L.A., Queiroz, J.H., 2012. An extracellular serine protease of an isolate of *Duddingtonia flagrans* nematophagous fungus. *Biocontrol Sci. Tech.* 22, 1131-1142.
- Braga, F.R., Araujo, J.M., Silva, A.R., Araújo, J.V., Carvalho, R.V., Soares, F.E.F., Queiroz, J.H., Gênier, H.L.A., 2011. Ação ovicida do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma* sp. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44, 116-118.
- Braga, F.R., Soares, F.E.F., Araujo, J.M., Fonseca, L.A., Hiura, E., Garschagen Gava, M., Vieira, F.T., Paz, J.S., Carvalho, L.M., Faccini, J.V., Queiroz, J.H., Araújo, J.V., 2014. Statistical experimental design to assess the influence of enzymes of nematophagous fungi versus helminthes. *Res. Vet. Sci.* 97, 527–532.
- Butschi, A., Titz, A., Wälti, M.A., Olieric, V., Paschinger, K., Nöbauer, K., Guo, X., Seeberger, P.H., Wilson, I.B., Aebi, M., Hengartner, M.O., Künzler, M., 2010. *Caenorhabditis elegans* N-glycan core beta-galactoside confers sensitivity towards nematotoxic fungal galectin CGL2. *PLoS Pathog.* 6, e1000717.
- Caldwell, F.C., Caldwell, F.L., 1929. A study of the anthelmintic efficacy of Higuero latex in the treatment of trichuriasis, with comment as to its effectiveness against *Ascaris* infestation. *Am. J. Trop. Med.* 9, 471-482.
- Cappello, M., Bungiro, R.D., Harrison, L.M., Bischof, L.J., Griffiths, J.S., Barrows, B.D., Aroian, R.V., 2006. A purified *Bacillus thuringiensis* crystal protein with therapeutic activity against the hookworm parasite *Ancylostoma ceylanicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 15154–15159.
- Cezar, A.S., Catto, J.B., Bianchin, I., 2008. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. *Cienc. Rural* 38, 2083-2091.
- Colgrave, M.L., Kotze, A.C., Huang, Y.H., O'Grady, J., Simonsen, S.M., Craik, D.J., 2008a. Cyclotides: natural, circular plant peptides that possess significant activity

- against gastrointestinal nematode parasites of sheep. *Biochemistry* 47, 5581–5589.
- Colgrave, M.L., Kotze, A.C., Ireland, D.C., Wang, C.K., Craik, D.J., 2008b. The anthelmintic activity of the cyclotides: natural variants with enhanced activity. *ChemBioChem* 9, 1939-1945.
- De Pasquale, A., 1984. Pharmacognosy: the oldest modern science. *J. Ethnopharmacol.* 11, 1-16.
- Dimitrov, D.S., 2012. Therapeutic proteins. *Methods Mol. Biol.* 899, 1-26.
- Durmaz, E., Hu, Y., Aroian, R.V., Klaenhammer, T.R., 2016. Intracellular and Extracellular Expression of *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Cry5B in *Lactococcus lactis* for Use as an Anthelmintic. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1286-1294.
- Felix, C.R., Noronha, E.F., Marco, J.L. Protease: características e aplicações industriais. In: S. Said; R.C.L.R Pietro. *Enzimas como agents biotecnológicos*, Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 115-129, 2004.
- Fetterer, R.H., Rhoads, M.L., 1993. Biochemistry of nematode cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. *Vet. Parasitol.* 46, 103-111.
- George, M., Abraham, T.E., 2006. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *J. Control. Release* 114, 1-14.
- Geurden, T., Chartier, C., Fanke, J., Regalbono, A.F., Traversa, D., Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Vanimisetti, H.B., Bartram, D.J., Denwood, M.J., 2015. Anthelmintic resistance to ivermectin and moxidectin in gastrointestinal nematodes of cattle in Europe. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 5, 163-171.
- Gopal, R.M., Pomroy, W.E., West, D.M., 1999. Resistance of field isolates of *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* to ivermectin. *Int. J. Parasitol* 29, 781-786.
- Griffitts, J.S., Huffman, D.L., Whitacre, J.L., Barrows, B.D., Marroquin, L.D., Müller, R., Brown, J.R., Hennet, T., Esko, J.D., Aroian, R.V., 2003. Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin–host interactions. *J Biol Chem.* 278, 45594–45602.
- Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R.S., Barros, A.T.M., Andreotti, R., Cancado, P.H.D., Perez de Leon, A.A., Pereira, J.B., Villela, H.S., 2014. Reassessment of the

- potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Ver. Bras. Parasitol. Vet. 23, 150-156.
- Hansson, A., Veliz, G., Naquira, C., Amren, M., Arroyo, M., Arevalo, G., 1986. Preclinical and clinical studies with latex from *Ficus glabrata* HBK, a traditional intestinal anthelmintic in the Amazonian area. J. Ethnopharmacol. 17, 105-138.
- Heim, C., Hertzberg, H., Butschi, A., Bleuler-Martinez, S., Aebi, M., Deplazes, P., Künzler, M., Štefanić, S., 2015. Inhibition of *Haemonchus contortus* larval development by fungal lectins. Parasit. Vectors 8, 425.
- Hu, Y., Georgiou, S.B., Kelleher, A.J., Aroian, R.V., 2010a. *Bacillus thuringiensis* Cry5B Protein Is Highly Efficacious as a Single-Dose Therapy against an Intestinal Roundworm Infection in Mice. PLoS Negl. Trop. Dis. 4, e614.
- Hu, Y., Platzer, E.G., Bellier, A., Aroian, R.V., 2010b. Discovery of a highly synergistic anthelmintic combination that shows mutual hypersusceptibility. PNAS 107, 5955-5960.
- Hui, F., Scheib, L., Hu, Y., Sommer, R.J., Aroian, R.V., Ghosh, P., 2012. Structure and glycolipid binding properties of the nematicidal protein Cry5B. Biochemistry 51, 9911–9921.
- Iatsenko, I., Boichenko, I., Sommer, R.J., 2014. *Bacillus thuringiensis* DB27 produces two novel protoxins, Cry21Fa1 and Cry21Ha1, which act synergistically against nematodes. Appl. Environ. Microbiol. 80, 3266-3275.
- Junwei, W., Qingling, M., Jun, Q., Weisheng, W., Shuangqing, C., Jianxun, L., Chunguang, Z., Chuangfu, C., 2013. The recombinant serine protease XAoz1 of *Arthrobotrys oligospora* exhibits potent nematicidal activity against *Caenorhabditis elegans* and *Haemonchus contortus*. FEMS Microbiol. Lett. 344, 53-59.
- Khan, A., Williams, K.L., Nevalainen, H.K.M., 2004. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. Biol. Control. 31, 346–352.
- Klafke, G.B., Moreira, G.M., Monte, L.G., Pereira, J.L., Brandolt, T.M., Xavier, M.O., Santi-Gadelha, T., Dellagostin, O.A., Pinto, L.S., 2013. Assessment of plant lectin antifungal potential against yeasts of major importance in medical mycology. Mycopathologia 175, 147-151.

- Kotze, A.C., O'grady, J., Gough, J.M., Pearson, R., Bagnall, N.H., Kemp, D.H., Akhurst, R.J., 2005. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. *Int. J. Parasitol.* 35, 1013-1022.
- Lam, S.K., Ng, T.B., 2009. A protein with antiproliferative, antifungal and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from caper (*Capparis spinosa*) seeds. *Phytomedicine* 16, 444-450.
- Lam, S.K., Ng, T.B., 2011. Lectins: production and practical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 45-55.
- Leveck, B., Buttle, D., Behnke, J.M., Duce, I.R., Vercruysse, J., 2014. Cysteine proteinases from papaya (*Carica papaya*) in the treatment of experimental *Trichuris suis* infection in pigs: two randomized controlled trials. *Parasit. Vectors* 7, 1-8.
- Lien, S., Lowman, H.B., 2003. Therapeutic peptides. *Trends Biotechnol.* 21, 556–562.
- Lima, M.E., Carneiro, M.E., Nascimento, A.E., Grangeiro, T.B., Holanda, M.L., Amorim, R.C., Benevides, N.M., 2005. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Agric. Food Chem.* 53, 6414–6419.
- Liu, R., Mu, L., Liu, H., Wei, L., Yan, T., Chen, M., Zhang, K., Li, J., You, D., Lai, R., 2011. Two antimicrobial and nematicidal peptides derived from sequences encoded *Picea sitchensis*. *J. Pept. Sci.* 17, 627-631.
- Lopez-Llorca, L.V., 1990. Purification and properties of extracellular proteases produced by the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium*. *Can. J. Microbiol.* 36, 530-537.
- Luo, X., Chen, L., Huang, Q., Zheng, J., Zhou, W., Peng, D., Ruan, L., Sun, M., 2013. *Bacillus thuringiensis* metalloproteinase Bmp1 functions as a nematicidal virulence factor. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 460-468.
- Luoga, W., Mansur, F., Lowe, A., Duce, I.R., Buttle, D.J., Behnke, J.M., 2015. Factors affecting the anthelmintic efficacy of papaya latex in vivo: host sex and intensity of infection. *Parasitol. Res.* 114, 2535-2541.
- Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N., 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17, 193-199.

- Mansfield, L.S., Gamble, H.R., Fetterer, R.H., 1992. Characterization of the eggshell of *Haemonchus contortus* – I. Structural components. *Comp. Biochem. Physiol. B* 29, 681-686.
- Marroquin, L.D., Elyassnia, D., Griffiths, J.S., Feitelson, J.S., Aroian, R.V., 2000. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 155, 1693-1699.
- Martin P. Beyond the next generation of therapeutic proteins. *Protein Eng* [online] 2006.
- Miller, P.M., Sands, D.C., 1977. Effects of hydrolytic enzymes on plant-parasitic nematodes. *J. Nematol.* 9, 192-197.
- Morishita, M., Peppas, N.A., 2006. Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery? *Drug Discov. Today* 11, 905-910.
- Nabukenya, I., Rubaire-Akiiki, C., Olila, D., Muhangi, D., Höglund, J., 2014. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in goats and evaluation of FAMACHA diagnostic marker in Uganda. *Vet. Parasitol.* 205, 666–675.
- Nelson DL, Cox MM. 2006. *Lehninger: Princípios de Bioquímica*. 4ª edição, Editora Sarvier, São Paulo, SP, Brasil, p 156-189.
- Nieuwhof, G.J., Bishop, S.C., 2005. Costs of the major endemic diseases of sheep in Great Britain and the potential benefits of reduction in disease impact. *Anim. Sci.* 81, 23-29.
- Oliveira, L.M.B., Bevilaqua, C.M.L, Macedo, I.T.F, Morais, S.M., Monteiro, M.V.B., Campello, C.C., Ribeiro, W.L.C., Batista, E.K.F., 2011. Effect of six tropical tanniferous plant extracts on larval exsheathment of *Haemonchus contortus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20, 155-160.
- Papagianni, M., 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol. Adv.* 21, 465-499.
- Paschinger, K., Wilson, I.B., 2015. Two types of galactosylated fucose motifs are present on N-glycans of *Haemonchus contortus*. *Glycobiology* 256, 585-90.
- Pechan, T., Ye, L., Chang, Y., Mitra, A., Lin, L., Davis, F.M., Williams, W.P., Luthe, D.S.A., 2000. Unique 33-kD Cysteine Proteinase Accumulates in Response to Larval Feeding in Maize Genotypes Resistant to Fall Armyworm and Other Lepidoptera. *The Plant Cell* 12,1031-1041.

- Ríos-de-Álvarez, L., Jackson, F., Greer, A., Bartley, Y., Bartley, D.J., Grant, G., 2012a. In vitro screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties. *Vet. Parasitol.* 186, 390-398.
- Ríos-de-Álvarez, L., Jackson, F., Greer, A., Grant, G., Jackson, E., Morrison, A.A., Huntley, J.F., 2012b. Direct anthelmintic and immunostimulatory effects of oral dosing semi-purified phytohaemagglutinin lectin in sheep infected with *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.* 187, 267-274.
- Robbins, B.H., 1930. A proteolytic enzyme in ficin, the anthelmintic principle of Leche de Higueron. *J. Biol. Chem.* 87, 251-257.
- Sáez, M.I., Barros, A.M., Vizcaíno, A.J., López, G., Alarcón, F.J., Martínez, T.F., 2015. Effect of alginate and chitosan encapsulation on the fate of BSA protein delivered orally to gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Anim. Feed. Sci. Tech.* 210, 114-124.
- Salles, H.O., Braga, A.C.L., Nascimento, M.T.S.C, Sousa, A.C.P., Lima, A.R., Vieira, L.S., Cavalcante, A.C.R., Egito, A.S., Andrade, L.B.S., 2014. Lectin, hemolysin and protease inhibitors in seed fractions with ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 23, 136-143.
- Satrija, F., Nansen, P., Bjorn, H., Murtini, S., He, S., 1994. Effect of papaya latex against *Ascaris suum* in naturally infected pigs. *J. Helminthol.* 68, 343-346.
- Sayers, C.A., Sweeney, T., 2005. Gastrointestinal nematode infection in sheep – a review of the alternatives to anthelmintics in parasite control. *Anim. Health Res. Rev.* 6, 159-171.
- Shaji, J., Patole, V., 2008. Protein and Peptide drug delivery: oral approaches. *Indian J. Pharm. Sci.* 70, 269-277.
- Silva, M.C.C., Paula, C.A.A., Ferreira, J.G., Paredes-Gamero, E.J., Vaz, A.M.S.F., Sampaio, M.U., Correia, M.T.S., Oliva, M.L.V., 2014. *Bauhinia forficata* lectin (BfL) induces cell death and inhibits integrin-mediated adhesion on MCF7 human breast cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 2262-2271.
- Soares, A.M.S., Araújo, S.A., Lopes, S.G., Costa-Junior, L.M., 2015. Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* protein extracts on *Haemonchus contortus*. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 24, 396-401.

- Soares, F.E.F., Braga, F.B., Araújo, J.V., Lima, W.S., Mozer, L.R., Queiróz, J.H., 2012. In vitro activity of a serine protease from *Monacrosporium thaumasium* fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. *Parasitol. Res.* 110, 2423-2427.
- Soares, F.E.F., Queiroz, J.H., Braga, F.R., Lima, W.S., Zamprogno, T.T., Araújo, J.V., 2014. Proteolytic activity of the nematophagous fungus *Arthrobotrys sinensis* on *Angiostrongylus vasorum* larvae. *BMC Research Notes* 7, 811.
- Steppek, G., Buttle, D.J., Duce, I.R., Lowe, A., Behnke, J.M., 2005. Assessment of the anthelmintic effect of natural plant cysteine proteinases against the gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, in vitro. *Parasitology* 130, 203-211.
- Steppek, G., Lowe, A.E., Buttle, D.J., Duce, I.R., Behnke, J.M., 2006. In vitro and in vivo anthelmintic efficacy of plant cysteine proteinases against the rodent gastrointestinal nematode, *Trichuris muris*. *Parasitology* 132, 681-689.
- Steppek, G., Lowe, A.E., Buttle, D.J., Duce, I.R., Behnke, J.M., 2007a. Anthelmintic action of plant cysteine proteinases against the rodent stomach nematode, *Protospirura muricola*, in vitro and in vivo. *Parasitology* 134, 103-112.
- Steppek, G., Lowe, A.E., Buttle, D.J., Duce, I.R., Behnke, J.M., 2007b. The anthelmintic efficacy of plant-derived cysteine proteinases against the rodent gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, in vivo. *Parasitology* 134, 1409-1419.
- Tikhonov, V.E., Lopez-Llorca, L.V., Salinas, J., Jansson, H-B., 2002. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. *Fungal Genet. Biol.* 35, 67-78.
- Tobata-Kudo, H., Kudo, H., Tada, I., 2005. *Strongyloides ratti*: chemokinesis of glycolytic enzyme- and lectin-treated third-stage infective larvae in vitro. *Parasitol. Int.* 54, 147-152.
- Urban, J.F. Jr., Hu, Y., Miller, M.M., Scheib, U., Yiu, Y.Y., Aroian, R.V., 2013. *Bacillus thuringiensis*-derived Cry5B has potent anthelmintic activity against *Ascaris suum*. *PLoS negl. Trop. Dis.* 7, e2263.
- Waller, P.J., 2003. The future of anthelmintics in sustainable parasite control programs for livestock. *Helminthologia* 40, 97-102.

- Wei, J.Z., Hale, K., Carta, L., Platzer, E., Wong, C., Fang, S.C., Aroian, R.V., 2003. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 2760–2765.
- Wharton, D.A., 1980. Nematode egg-shells. Parasitology 81, 447– 463.
- Wohlschlager, T., Butschi, A., Zurfluh, K., Vonesch, S.C., Keller, U., Gehrig, P., Bleuler-Martinez, S., Hengartner, M.O., Aebi, M., Künzler, M., 2011. Nematotoxicity of *Marasmius oreades* agglutinin (MOA) depends on glycolipid binding and cysteine protease activity. J. Biol. Chem. 286, 30337-30343.
- Yang, J., Liang, L., Li, J., Zhang, K-Q., 2013. Nematicidal enzymes from microorganisms and their applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 7081-7095.
- Zang, X., Maizels, R.M., 2001. Serine proteinase inhibitors from nematodes and the arms race between host and pathogen. Trends Biochem. Sci. 26, 191-197.
- Zhang, F., Peng, D., Cheng, C., Zhou, W., Ju, S., Wan, D., Yu, Z., Shi, J., Deng, Y., Wang, F., Ye, X., Hu, Z., Lin, J., Ruan, L., Ming, S., 2016. *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Cry6Aa Triggers *Caenorhabditis elegans* Necrosis Pathway Mediated by Aspartic Protease (ASP-1). PLoS Pathog. 12, e1005389.

CAPÍTULO III - ARTIGO

Obtenção de protease do látex de *Ficus benjamina* com ação sobre *Haemonchus contortus*

Resumo

Haemonchus contortus é um endoparasito gastrointestinal de pequenos ruminantes responsável por elevadas taxas de mortalidade nos rebanhos. O controle desse parasito é realizado principalmente com produtos químicos sintéticos, contudo, a resistência aos anti-helmínticos torna necessária a busca contínua por novas moléculas bioativas. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o potencial anti-helmíntico de extratos proteicos e de protease obtidos do látex de *Ficus benjamina* sobre larvas de *H. contortus*. O látex foi coletado em tampão fosfato de sódio (75 mM, pH 7,0) a partir de uma incisão feita no ápice do galho das plantas. Para remoção da borracha, o material foi centrifugado (12.000 x g, 4 °C, 15 min), dialisado contra água (cut-off 14 kDa) e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante final foi denominado extrato proteico do látex (EPL) e fracionado com sulfato de amônio nas saturações 30-60% e 60-90% para obtenção das frações nomeadas F30-60 e F60-90, respectivamente. A F60-90 foi fracionada por cromatografia em matriz de CM-Cellulose. O perfil proteico foi visualizado em SDS-PAGE (12%) por coloração com nitrato de prata. O teor de proteínas das amostras foi quantificado e a atividade proteolítica foi medida pela hidrólise da azocaseína. A massa molecular e a identidade proteica foram reveladas por espectrometria de massas. A ação biológica foi avaliada em testes de inibição do desenvolvimento larvar sobre *H. contortus*. EPL, F30-60 e F60-90 apresentaram, respectivamente, 121,5, 21,2, 75,7 mg de proteína total. A atividade proteolítica das amostras proteicas foi de 43.471, 13.245 e 57.857 UA/mL/mgP para EPL, F30-60 e F60-90, respectivamente. A fração com maior atividade proteolítica obtida após fracionamento cromatográfico da F60-90 foi denominada FbP (de, *Ficus benjamina* Protease) que teve atividade proteolítica de 36.393,8 UA/mL/mgP. A análise em gel

mostrou que a FbP tinha uma proteína majoritária com massa entre 20 e 30 kDa. Por espectrometria de massas, a massa molecular da proteína foi estimada em 23,97 kDa. A análise de similaridade revelou que os peptídeos gerados pela hidrólise da FbP apresentavam similaridade apenas com proteases cisteínicas vegetais. A FbP teve atividade proteolítica estável entre pH 6,0 e pH 10 e atividade em uma ampla faixa de temperatura, com atividade ótima a 60 °C. Nos testes biológicos, as amostras EPL, F30-60, F60-90 e FbP apresentaram, respectivamente, IC₅₀ de 0,22, 1,38, 0,42 e 0,26 mg/mL sobre o desenvolvimento de larvas de *H. contortus*. Concluímos que o látex de *F. benjamina* tem ao menos uma protease cisteínica com propriedades anti-helmínticas sobre estádios larvais de *H. contortus*, constituindo-se uma alternativa promissora para o desenvolvimento de produtos a serem utilizados em programas de controle desse parasito.

Palavras-chave: Proteína, pH, temperatura, anti-helmíntico, larva.

Destaques:

- A ação anti-helmíntica de extratos proteicos e de protease do látex de *Ficus benjamina* sobre *Haemonchus contortus* foi examinada.
- A protease tem elevada atividade proteolítica em uma ampla faixa de temperatura.
- A protease tem atividade estável entre pH 6,0 e pH 10.
- O extrato, as frações proteicas e a fração de protease cisteínica do látex de *F. benjamina* exerceram efeito inibitório sobre o desenvolvimento de larvas de *H. contortus*.

1. Introdução

O parasitismo por nematóides gastrointestinais é um importante problema de saúde que afeta a criação de pequenos ruminantes, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais (Taylor et al., 2007). Dentre os diversos parasitos que acometem caprinos e ovinos, *Haemonchus contortus* é considerado o principal responsável por perdas econômicas para a ovinocaprinocultura, por ser de elevada prevalência e patogenicidade. No intento de reduzir os prejuízos e tornar viável a produção, os

produtores pecuários realizam o controle desse parasito baseando-se principalmente no uso de drogas químicas sintéticas, contudo, a resistência aos fármacos comumente utilizados incita o desenvolvimento de novos tratamentos e estratégias alternativas de controle (Papadopoulos, 2008).

Como alternativa, tem-se buscado identificar produtos de origem vegetal com atividade anti-helmíntica, avaliando o potencial de muitas plantas e seus extratos contra *H. contortus* (Squires et al., 2011). As plantas possuem diversas moléculas bioativas que são responsáveis pela proteção ao ataque de patógenos e parasitos, mas o potencial dessas moléculas no controle de parasitos de animais também tem sido comprovado.

As proteases têm se mostrado uma alternativa promissora para o controle de nematóides. Proteases são proteínas capazes de hidrolisar ligações peptídicas. Nas plantas, são responsáveis pela regulação de processos biológicos de reconhecimento de patógenos, bem como pela indução de respostas de defesa contra os mesmos. Tais enzimas, encontradas em sementes, látex ou frutos de espécies como *Ananas comosus*, *Carica papaya*, *Ficus carica*, dentre outras, têm sido avaliadas quanto ao seu potencial anti-helmíntico sobre nematóides gastrointestinais, no entanto, aspectos físico-químicos importantes como pH e temperatura ideal de atividade da enzima não têm sido avaliados (Domsalla; Melzig, 2008; Antao et al., 2005; Salas et al., 2015). Nessa perspectiva, se a exploração de potenciais produtos vegetais anti-helmínticos apresenta crescente avanço no intuito da obtenção de medicamentos para o tratamento de animais, é importante que haja o subsequente isolamento e caracterização de seus princípios ativos, como parte da promoção do progresso (Behnke et al., 2008).

Desse modo, este trabalho relata a ação anti-helmíntica de frações proteicas e de protease obtidas a partir do látex de *Ficus benjamina* sobre o nematóide gastrintestinal *H. contortus*, visando contribuir para o conhecimento do uso de proteínas como parte de programas de controle de nematóides gastrointestinais.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção do látex e extração das proteínas solúveis

O látex de *F. benjamina* L. foi obtido a partir de plantas adultas encontradas em São Luís, Maranhão, Brasil (2°33'13.3"S 44°18'20.2"W). A exsicata do material vegetal foi depositada no Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão sob o número de registro 1457 no ano 2016. O látex foi extraído a partir de incisões feitas no ápice dos galhos das plantas e recolhido em tubo contendo tampão fosfato de sódio (75 mM; pH 7,0) sob condições de resfriamento em banho de gelo. Para remoção da borracha, o látex foi, inicialmente, centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi dialisado contra água destilada (cut-off 14 kDa) e posteriormente centrifugado nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante resultante foi denominado extrato proteico do látex (EPL) e mantido a - 20 °C para ser utilizado nas etapas posteriores.

2.2. Fracionamento com sulfato de amônio

O EPL foi fracionado com sulfato de amônio nas saturações 30-60% e 60-90% sendo as frações denominadas F30-60 e F60-90, respectivamente. Em banho de gelo e sob leve agitação, o sulfato de amônio foi adicionado lentamente ao EPL. Em seguida a mistura permaneceu em repouso por 12 horas. Ao término do tempo, a mistura foi centrifugada a 15.000 x g por 30 minutos a 5 °C. O precipitado foi dialisado contra água destilada (cut-off 14 kDa) para remoção do sulfato de amônio e o sobrenadante utilizado para a próxima saturação.

2.3. Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi mensurada pela hidrólise da azocaseína (XAVIER-FILHO et al.,1989). A amostra (0,2 mL) foi incubada com 0,3 mL de tampão fosfato de sódio (25 mM, pH 6,0), 0,002 mL de ditioneitol (1 M) e 0,2 mL de azocaseína (1%) por 60 minutos a 37 °C. Após, a reação foi interrompida pela adição de 0,3 mL de ácido tricloroacético (20%, m/v). A mistura foi centrifugada (10.000 x g por 10

min) e 0,5 mL do sobrenadante foi misturado com igual volume de NaOH 2 M. A absorbância foi verificada a 420 nm. A variação de 0,01 de absorbância foi considerada como uma unidade de atividade proteolítica que foi expressa em unidade de atividade por mililitro por miligrama de proteína (UA/mL/mgP).

2.4. Fracionamento por cromatografia

A fração de sulfato de amônio com maior atividade proteolítica foi aplicada em coluna de troca iônica (CM-Cellulose) previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, a um fluxo de 0,8 mL/min. Para eluir as proteínas ligadas à matriz, foi utilizado 50 e 100 mM de NaCl adicionado ao tampão de equilíbrio. A eluição foi realizada no mesmo fluxo do equilíbrio da coluna. A fração das proteínas não ligadas à matriz foi denominada FNR e as frações eluídas com 50 e 100 mM foram nomeadas de FbP (*Ficus benjamina* Protease) e F100, respectivamente (Figura 1S). As amostras foram dialisadas contra água destilada (cut-off 14 kDa) para remoção do NaCl.

2.5. Determinação do teor proteico

O teor de proteínas dos extratos foi determinado pelo método de Bradford (1976). A concentração proteica foi calculada a partir da curva padrão feita com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As proteínas foram visualizadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%) (Laemmli, 1970) corado com nitrato de prata (Gromova; Celis, 2006). Utilizou-se um marcador molecular contendo proteínas de massa conhecida: Fosforilase b de coelho (97 kDa), Albumina Sérica Bovina (66 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Anidrase Carbônica (30 kDa), Inibidor de Tripsina da soja (20,1 kDa) e alfa-Lactalbumina de soja (14,4 kDa) (GE healthcare, código 17044601).

2.7. Determinação do pH e temperatura ótimos da FbP

A determinação do pH e temperatura ótimos de atividade enzimática foi feita pela medição da atividade proteolítica adequando-se o pH e a temperatura, respectivamente, de acordo com o protocolo padrão acima descrito. O pH ótimo foi determinado por medição da atividade enzimática em pHs variando de 6 a 12 substituindo-se o tampão do ensaio padrão por: fosfato de sódio (pH 6,0); tris-HCl (pHs 8,0 e 10); glicina-NaOH (pH 12). Todos os tampões na concentração de 50 mM. A temperatura ideal foi determinada por meio de ensaios realizados em temperaturas variando 10 °C (10 a 70°C) no pH do ensaio padrão (pH 6,0).

2.8. Identificação e determinação da massa molecular

A identidade e a massa molecular da FbP foram determinadas por espectrometria de massas. A identidade da FbP foi revelada por análise de similaridade dos fragmentos peptídicos. Para isso, uma alíquota da FbP foi inicialmente tripsinizada e os fragmentos foram separados em coluna de RP (fase reversa) de 24 cm acoplada ao espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap XL usando o sistema nLC-Easy II. Os espectros (MS/MS) foram adquiridos e analisados utilizando o software Xcalibur (versão 2.0.7). Os dados foram submetidos ao banco de dados NCBI all entries.

2.9. Teste de desenvolvimento larvar

A atividade biológica foi avaliada por meio do teste de inibição do desenvolvimento larvar (Hubert e Kerboeuf, 1992). Aproximadamente 100 ovos foram colocados em placas de 24 poços e mantidos em estufa BOD (27 °C, UR $\geq$ 80%) por 24 horas para obtenção de L₁. Adicionou-se aos poços o meio nutritivo (contendo *Echerichia coli* liofilizada ATCC 9637 Sigma, extrato de levedura e solução salina balanceada de Earle), Anfotericina B e as amostras proteicas em diluição seriada. As placas foram novamente incubadas (BOD 27 °C, UR $\geq$ 80%) e após 5 dias, lugol foi adicionado em cada poço para interromper o desenvolvimento das larvas. A contagem de L₁ e L₃ vivas foi realizada para o cálculo de inibição do

desenvolvimento. O percentual de desenvolvimento foi calculado pela relação número de L_3 / (número de L_3 + número de L_1) x 100. A eficácia foi calculada utilizando a formula (% desenvolvimento do controle negativo - % desenvolvimento do tratamento) / % desenvolvimento do controle negativo) x 100. Para os testes biológicos, as amostras foram inicialmente liofilizadas até estado de pó e ressuspensas em tampão fosfato de sódio-potássio (pH 7,0), utilizado como controle negativo.

2.10. Análise estatística

Os experimentos foram feitos em triplicata e os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Os dados bioquímicos foram analisados por ANOVA seguido do teste Tukey utilizando o programa InfoStat (versão livre, 2013) a 5% de significância. A IC_{50} foi calculada por análise probit (LeOra Software Company PoloPlus 2.0) e expressa como média e intervalo de confiança (95%). Valores de IC_{50} sem sobreposição no intervalo de confiança foram considerados significativamente diferentes (Roditakis, et al., 2005).

3. Resultados

3.1. Obtenção e caracterização da FbP

Após coleta do látex em solução tampão, obtivemos um material de aspecto leitoso, que foi processado para remoção de componentes não proteicos, sobretudo a borracha. Com o processamento, obtivemos um material translúcido de coloração levemente amarelada, que foi denominado extrato proteico do látex (EPL). O EPL foi inicialmente fracionado com sulfato de amônio e obtivemos duas frações proteicas, a F30-60 e F60-90, com recuperação de 17% e 62% do total de proteínas, respectivamente (Tabela 1).

A atividade proteolítica do EPL foi verificada na F30-60, mas foi maior na fração F60-90 (Tabela 1). Por ter apresentado maior atividade proteolítica, a F60-90 foi novamente fracionada por cromatografia (CM-Cellulose) (Figura 2SA). Das três frações cromatográficas obtidas, a atividade proteolítica foi maior na fração eluída

com 50 mM de NaCl, assim, a fração foi nomeada FbP (de, *Ficus benjamina* Protease) (Figura 2SB).

Tabela 1. Teor de proteínas e atividade proteolítica das amostras proteicas obtidas a partir do látex de *Ficus benjamina*

Amostra proteica	Proteína Total (mg)	Atividade proteolítica (UA/mL/mgP)
EPL	121,6 ± 4,6 A	43.471,1 ± 4760,2 B
F30-60	21,2 ± 0,7 C	13.245,9 ± 3217,0 C
F60-90	75,7 ± 1,0 B	57.857,5 ± 5997,4 A
FbP	1,23 ± 0,3 D	36.393,8 ± 6.878,3 B

Na coluna, médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. EPL: extrato proteico do látex; F30-60: fração obtida pela precipitação do EPL com a saturação 30-60% de sulfato de amônio; F60-90: fração obtida pela precipitação do EPL com a saturação 60-90% de sulfato de amônio; FbP: *Ficus benjamina* protease, fração obtida pelo fracionamento cromatográfico da F60-90 eluída com 50 mM de NaCl.

A análise qualitativa em gel de poliacrilamina (SDS-PAGE 12%) mostrou que a FbP apresenta uma banda proteica majoritária com massa entre 20 e 30 kDa (Figura 1). Por espectrometria de massas, a proteína teve massa molecular estimada em 23,972 kDa. Os peptídeos gerados pela hidrólise da FbP mostraram similaridade apenas com proteases cisteínicas vegetais (Tabela 2).

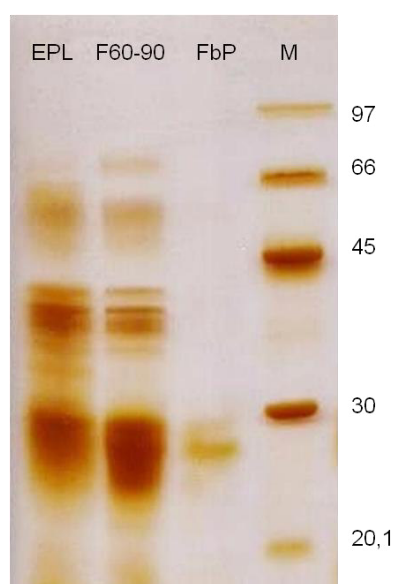


Figura 1. SDS-PAGE (12%) das frações utilizadas para obtenção da FbP. EPL: extrato proteico do látex; F60-90: fração obtida pela precipitação do EPL com a saturação 60-90% de sulfato de amônio; FbP: *Ficus benjamina* protease, fração obtida pelo fracionamento cromatográfico da F60-90 eluída com 50 mM de NaCl; M: marcador molecular (kDa).

Tabela 2. Similaridade da FbP com outras proteases cisteínicas de plantas

Acesso	Cobertura ^a (%)	#Peptídeos ^b	#Único ^c	Massa média (kDa)	Descrição
—	—	—	—	23,972	FbP - Protease cisteínica de <i>Ficus benjamina</i>
gi 565443889	8	6	2	41,602	Proteína hipotética CARUB_v10005061mg [<i>Capsella rubella</i>]gi 482552647 gb EOA16840.1 proteína hipotética CARUB_v10005061mg [<i>Capsella rubella</i>]
gi 186516984	7	5	0	41,639	Protease cisteínica1 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]gi 15290508 gb AAK92229.1 Protease cisteínica [<i>Arabidopsis thaliana</i>] gi 332661313 gb AEE86713.1 protease cisteínica1 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
gi 297802228	7	6	1	41,547	Protease cisteínica [<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>] gi 297314834 gb EFH45257.1 Protease cisteínica [<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>]
gi 587864551	6	7	2	39,860	Protease cisteínica específica de germinação1 [<i>Morus notabilis</i>]
gi 470105671	5	6	0	42,599	PREDITO: protease cisteínica RD21a-like, parcial [<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>]
gi 422001787	15	4	1	25,524	Protease cisteínica específica de germinação1, parcial [<i>Raphanus sativus</i>]
gi 2511689	3	5	0	40,474	Protease cisteínica precursor [<i>Phaseolus vulgaris</i>]

FbP: *Ficus benjamina* protease, fração obtida pelo fracionamento cromatográfico da F60-90 eluída com 50 mM de NaCl; a: Percentual da sequência da proteína que corresponde à soma dos resíduos presentes nos peptídeos que identificam a proteína; b: peptídeos identificados por MSMS; c: peptídeos que só aparecem identificando a proteína no banco de dados utilizado.

A FbP mostrou ter atividade proteolítica estável na faixa de pH entre 6 e 10 (Figura 2A), quando incubada a 37 °C por 60 minutos. Mesmo sendo acentuadamente reduzida, a atividade enzimática foi verificada em pH mais extremo. A FbP manteve elevada atividade proteolítica na faixa de temperatura entre 40 e 70 °C, mas a atividade máxima foi atingida a 60 °C ($p \leq 0,05$) (Figura 2B).

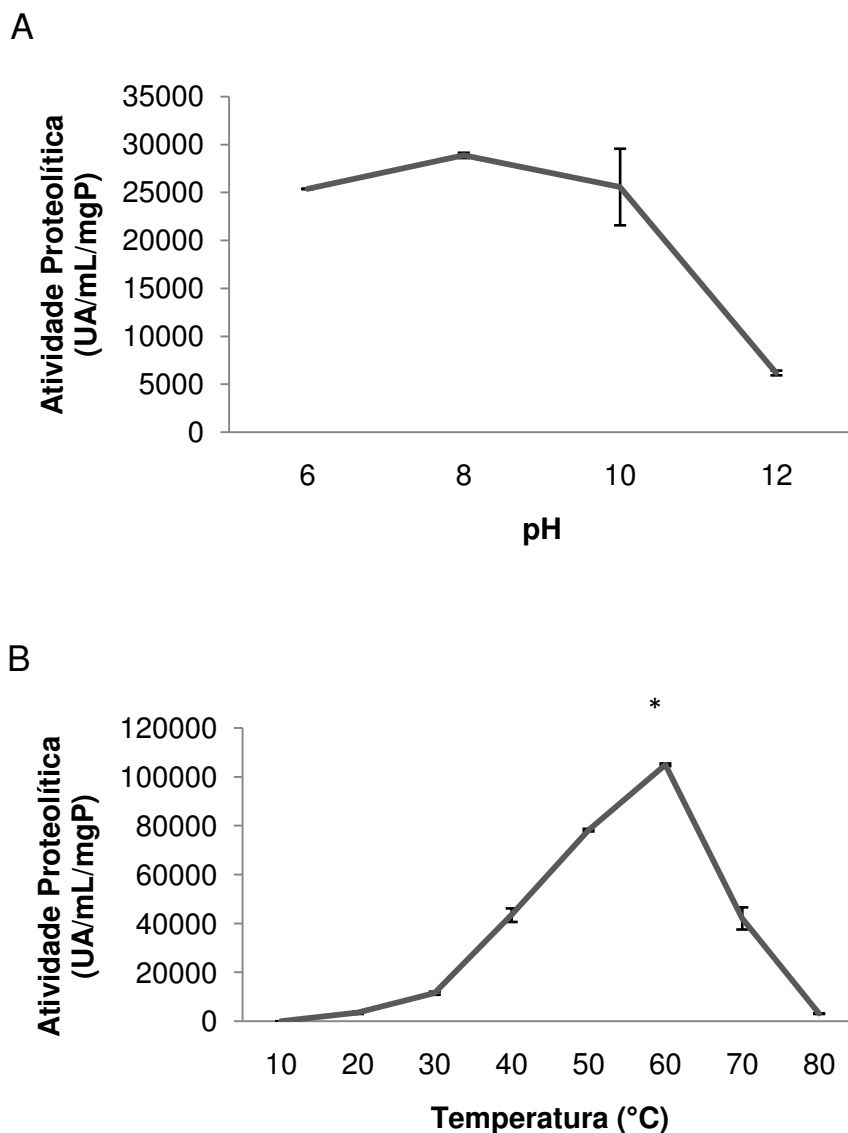


Figura 2. Caracterização para pH (A) e temperatura (B) ótimos de atividade da FbP (*Ficus benjamina* Protease). O ensaio de pH foi realizado a 37 °C utilizando os tampões: fosfato de sódio (pH 6,0); tris-HCl (pHs 8,0 e 10); glicina-NaOH (pH 12). Todos os tampões na concentração de 50 mM. A temperatura ideal foi determinada por meio de ensaios realizados em temperaturas variando 10 °C (10 a 70°C) no pH do ensaio padrão (pH 6,0). A atividade proteolítica nos pHs de 6,0 a 10 não diferiu estatisticamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). O asterisco indica maior atividade proteolítica em relação às demais temperaturas ($p \leq 0,05$).

3.2. Atividade biológica

A atividade biológica das amostras proteicas foi verificada em teste de desenvolvimento larvar com o EPL, as frações F30-60, F60-90 e a FbP. Os valores de IC_{50} variaram entre 0,22 a 1,38 mg/mL (Tabela 3). Eficiência em torno de 100%

foi obtida quando as larvas foram tratadas com 1 mg/mL das amostras EPL, F60-90 e a FbP, o mesmo efeito não foi observado quando as larvas foram tratadas com a amostra de menor atividade proteolítica, a F30-60.

Tabela 3: Eficácia média (% $\pm$ DP) e CI_{50} (IC 95%) das amostras proteicas obtidas do látex de *Ficus benjamina* na inibição do desenvolvimento de larvas de *Haemochus contortus*

Concentração (mg/mL)	Amostras proteicas			
	EPL	F30-60	F60-90	FbP
2,00	100,0 $\pm$ 0,0	65,0 $\pm$ 12,6	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
1,00	100,0 $\pm$ 0,0	40,3 $\pm$ 34,0	98,1 $\pm$ 1,3	100,0 $\pm$ 0,0
0,50	95,0 $\pm$ 1,5	10,8 $\pm$ 2,5	58,7 $\pm$ 13,3	87,3 $\pm$ 15,8
0,25	62,1 $\pm$ 6,0	11,4 $\pm$ 8,5	9,1 $\pm$ 1,4	14,0 $\pm$ 12,1
0,13	10,3 $\pm$ 5,2	0,0 $\pm$ 0,0	4,8 $\pm$ 5,5	9,0 $\pm$ 4,6
IC_{50} (mg/mL)	0,22 [0,21 - 0,23] A	1,38 [0,98 - 2,34] C	0,42 [0,33 - 0,54] B	0,26 [0,20 - 0,32] A

Na linha, letras iguais não diferem significativamente. DP: desvio padrão; IC: Intervalo de Confiança; CI_{50} : Concentração Inibitória; EPL: extrato proteico do látex; F30-60: fração obtida pela precipitação do EPL com a saturação 30-60% de sulfato de amônio; F60-90: fração obtida pela precipitação do EPL com a saturação 60-90% de sulfato de amônio; FbP: *Ficus benjamina* protease, fração obtida pelo fracionamento cromatográfico da F60-90 eluída com 50 mM de NaCl.

4. Discussão

O látex é uma mistura complexa que pode ser uma importante fonte de compostos ativos (Agrawal e Konno, 2009). Neste estudo relatamos a obtenção e caracterização parcial de protease cisteínica obtida do látex de *F. benjamina*. Outras proteases já foram purificadas a partir do látex de espécies do gênero *Ficus*, das quais a protease serínica de *F. religiosa*, a protease aspártica de *F. racemosa* e a protease serínica collagenolítica de *F. carica*, são exemplos (Devaraj et al., 2008; Kumari et al., 2010; Raskovic et al., 2014)

A análise de similaridade (Tabela 2) revelou que os peptídeos gerados pela hidrólise da FbP mostraram similaridade apenas com proteases cisteínicas vegetais. A massa molecular de 23,972 kDa da protease, determinada por espectrometria de massas, foi semelhante ao encontrado para proteases cisteínicas de outras plantas, tais como as purificadas do látex de *F. carica* (24,29 kDa) (Baeyens-Volant, et al.,

2015) e de *Pergularia extensa* (23,35 kDa) (Shivaprasad et al., 2010). Normalmente, o pH ótimo de proteases cisteínicas é distribuído nas regiões próximas do neutro (Salleh et al., 2006), mas FbP mostrou uma ampla faixa de estabilidade desde levemente ácido (pH 6,0) até em pH mais alcalino (pH 10) sem perda de atividade (Figura 2A). Microcapain, uma protease cisteínica de *Ficus microcarpa*, também mostrou atividade em ampla faixa de pH, mas parte da atividade foi perdida fora do pH ótimo da enzima (pH 8,0) (Mnif et al., 2015). A FbP também mostrou ter atividade proteolítica em uma ampla faixa de temperatura com atividade ótima a 60 °C (Figura 2B).

Proteases são enzimas que desempenham diversos papéis fisiológicos e de defesa nas plantas (Schaller, 2004). O papel dessas proteínas na ação direta como agente controlador de insetos herbívoros também tem sido sugerido (Mohan et al., 2006). Desde os primeiros relatos que atribuíram às proteases cisteínicas a ação anti-helmíntica do látex, essa classe de proteínas passou a ser investigada quanto ao seu potencial nematicida sobre diversos nematóides parasitos de animais que habitam as diferentes regiões do trato digestório (Robbins, 1930, Berger e Ansejo, 1940, Benke et al., 2008).

Experiências *in vitro* e *in vivo* demonstraram a ação eficiente de proteases sobre nematóides gastrointestinais adultos. No presente estudo, demonstramos que essa classe de enzima também é capaz de exercer efeito anti-helmíntico sobre larvas. Tanto a FbP, quanto as outras frações proteicas foram capazes de exercer efeito inibitório sobre o desenvolvimento de larvas com IC₅₀ de 0,22, 1,38, 0,42 e 0,26 mg/mL para o EPL, F30-60, F60-90 e FbP, respectivamente. Possivelmente a atividade do EPL e das frações F30-60 e F60-90 também foi mediada por proteases, pois os menores valores de IC₅₀ foram obtidos das amostras com maior atividade proteolítica (Tabelas 1 e 3), no entanto, estudos posteriores precisam ser realizados para confirmar essa hipótese.

Uma vez que são enzimas catalisadoras da hidrólise de ligações peptídicas, esta capacidade hidrolítica pode ser responsável pelas propriedades anti-helmínticas das proteases cisteínicas. Análises microscópicas de nematóides adultos tratados com protease cisteínica de várias plantas mostraram que a enzima age na cutícula protetora dos parasitos degradando e tornando-a enfraquecida o suficiente para que

a pressão hidrostática interna do corpo desintegre o nematóide (Stepek et al., 2006; Stepek et al., 2007).

Experiências *in vivo* demonstraram que suínos infectados que foram tratados com administração oral de látex de *C. papaya* apresentaram redução na carga de *Trichuris suis* com eficiência semelhante à obtida com alguns anti-helmínticos do mercado (Levecke et al., 2014). A administração oral do látex de *C. papaya* em ovelhas infectadas mostrou eficiência no controle do nematóide *H. contortus* (do abomaso), mas não sobre *Trichostrongylus colubriformis* (do intestino delgado) possivelmente devido à localização do parasito que tem parte do corpo inserida na mucosa intestinal, onde o contato com a enzima pode ser reduzido, corroborando com o mecanismo de ação sugerido para protease cisteínica, no qual a enzima precisa estar em contato com a cutícula para exercer efeitos deletérios (Buttle et al, 2011). Nos estudos supracitados, eficiência nematicida do látex foi atribuída à presença das proteases cisteínicas. O bloqueio da ação anti-helmíntica do látex *in vitro* pelo uso de inibidores de protease cisteínica reforça a hipótese de que o princípio ativo do látex são as proteases (Stepek et al., 2007).

Em uma perspectiva para utilização *in vivo*, a FbP mostrou características vantajosas, como atividade estável em uma ampla faixa de pH e temperatura (Figura 2), podendo suportar a passagem pelas câmaras pré-estomacais dos ruminantes para atuar no abomaso, habitat de *H. contortus*. O Abomaso corresponde ao estômago glandular dos ruminantes, e sob condições normais tem pH ácido (2-3), mas a infecção por *H. contortus* pode elevar o pH abomasal a valores próximos do neutro (6-7), faixa de atuação ótima da FbP (Nicholls et al, 1989; Buttle et al, 2011).

Apresentamos aqui uma protease cisteínica que interfere negativamente no desenvolvimento de larvas do nematóide gastrointestinal *H. contortus*, caracterizando-se como uma potencial alternativa para o desenvolvimento de produtos a serem utilizados em programas de controle desse parasito.

Referências

- Agrawal, A.A., Konno, K., 2009. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40, 311-331
- Antao, C.M., Malcata, F.X., 2005. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 637–650.
- Baeyens-Volant, D., Matagne, A.E.I., Mahyaoui, R., Wattiez, R., Azarkan, M., 2015. A novel form of ficin from *Ficus carica* latex: Purification and characterization. *Phytochemistry* 117, 154-167.
- Behnke, J.M., Buttle, D.J., Stepek, G., Lowe, A., Duce, I.R., 2008. Developing novel anthelmintics from plant cysteine proteinases. *Parasit. Vectors* 1, 29 doi: 10.1186/1756-3305-1-29.
- Berger, J., Asenjo, C.F., 1940. Anthelmintic activity of crystalline papain. *Science* 91, 387-388.
- Bradford, M.M., 1976. "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Buttle, D.J., Behnke, J.M., Bartley, Y., Elsheikha, H.M., Bartley, D.J., Garnett, M.C., Donnan, A.A., Jackson, F., Lowe, A., Duce, I.R., 2011. Oral dosing with papaya latex is an effective anthelmintic treatment for sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Parasit. Vectors* 4, 36. doi: 10.1186/1756-3305-4-36.
- Devaraj, K.B., Gowda, L.R., Prakash, V., 2008. An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). *Phytochemistry* 69, 647-655.
- Domsalla, A., Melzig, M.F., 2008. Occurrence and properties of proteases in plant lattices. *Planta Med.* 74, 699-711.
- Gromova I, Celis JE (2006). Protein detection in Gels by Silver Staining: A Procedure Compatible with Mass-Spectrometry. In: *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 3rd Edition, vol.4 Eds: Celis, J.E., Carter, N., Hunter, T., Simons, K., Small, J.V. and Shotton, D. (eds). Academic Press, Elsevier.
- Hubert, J., Kerboeuf, D., 1992. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet. Rec.* 130, 442-446.

- Kumari, M., Sharma, A., Jagannadham, M.V., 2010. Decolorization of crude latex by activated charcoal, purification and physico-chemical characterization of religiosin, a milk-clotting serine protease from the latex of *Ficus religiosa*. J. Agric. Food Chem. 58, 8027-8034.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- Levecke, B., Buttle, D., Behnke, J.M., Duce, I.R., Vercruysse, J., 2014. Cysteine proteinases from papaya (*Carica papaya*) in the treatment of experimental *Trichuris suis* infection in pigs: two randomized controlled trials. Parasit. Vectors 7, 1-8.
- Mnif, I.H., Siala, R., Nasri, R., Mhamdi, S., Nasri, M., Kamoun, A.S., 2015. A cysteine protease isolated from the latex of *Ficus microcarpa*: purification and biochemical characterization. Appl. Biochem. Biotechnol. 75, 1732-1744.
- Mohan, S., MA, P.W., Pechan, T., Bassford, E.R., Williams, W.P., Luthe, D.S., 2006. Degradation of the *S. frugiperda* peritrophic matrix by an inducible maize cysteine protease. J. Insect Physiol. 52, 21-28.
- Nicholls, C.D., Lee, D.L., 1989. Post-mortem changes in the abomasal mucosae of sheep infected with *Haemonchus contortus* compared with those in uninfected sheep. J Comp Pathol 100, 19-25.
- Papadopoulos, E., 2008. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. Small Ruminant Res. 76, 99-103.
- Raskovic B, Bozovic O, Prodanovic R, Niketic V, Polovic N, 2014. Identification, purification and characterization of a novel collagenolytic serine protease from fig (*Ficus carica* var. Brown Turkey) latex. J Biosci Bioeng 118, 622-627.
- Robbins, B.H., 1930. A proteolytic enzyme in ficin, the anthelmintic principle of Leche de Higueron. J. Biol. Chem. 87, 251-257.
- Roditakis, E., Roditake, N.E., Tsagkarakou, A., 2005. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete. Pest Manag. Sci. 61, 577-582.
- Salas, C.E., Badillo-Corona, J.A., Ramírez-Sotelo, G., Oliver-Salvador, C., 2015. Biologically Active and Antimicrobial Peptides from Plants. Biomed Res. Int. 2015, 1-11.

- Salleh, A.B., Razak, C.N.A., Rahman, R.N.Z.R.A., Basri, M., (2006). Protease: Introduction. In A. B. Salleh, R. N. Z. R. A. Rahman, & M. Basri (Eds.), *New lipases and proteases* (pp. 23–29). New York: Nova Science Publishers Inc.
- Schaller, A., 2004. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220, 183-197.
- Shivaprasad, H.V., Rajaiah, R., Frey, B.M., Frey, F.J., Vishwanath, B.S., 2010. 'Pergularain e I'-a plant cysteine protease with thrombin-like activity from *Pergularia extensa* latex. *Thromb. Res.* 125, e100-5.
- Squires, J.M., Ferreira, J.F.S., Lindsay, D.S., Zajac, A.M., 2011. Effects of artemisinin and *Artemisia* extracts on *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Vet. Parasitol.* 175,103-108.
- Steppek, G., Lowe, A.E., Buttle, D.J., Duce, I.R., Behnke, J.M., 2006. In vitro and in vivo anthelmintic efficacy of plant cysteine proteinases against the rodent gastrointestinal nematode, *Trichuris muris*. *Parasitology* 132, 681-689.
- Steppek, G., Lowe, A.E., Buttle, D.J., Duce, I.R., Behnke, J.M., 2007. Anthelmintic action of plant cysteine proteinases against the rodent stomach nematode, *Protospirura muricola*, in vitro and in vivo. *Parasitology* 134, 103-112.
- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2007. Parasites of sheep and goats. *Vet. Parasitol.* 3, 152-165.
- Xavier-Filho, J., Campos, F.A.P., Maria, A.P., Ary, M.B., Silva, C.P., Carvalho, M.M.M., Macedo, M.L.R., Lemos F.J.A., Grant G., 1989.. 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* 37, 1139-1143.

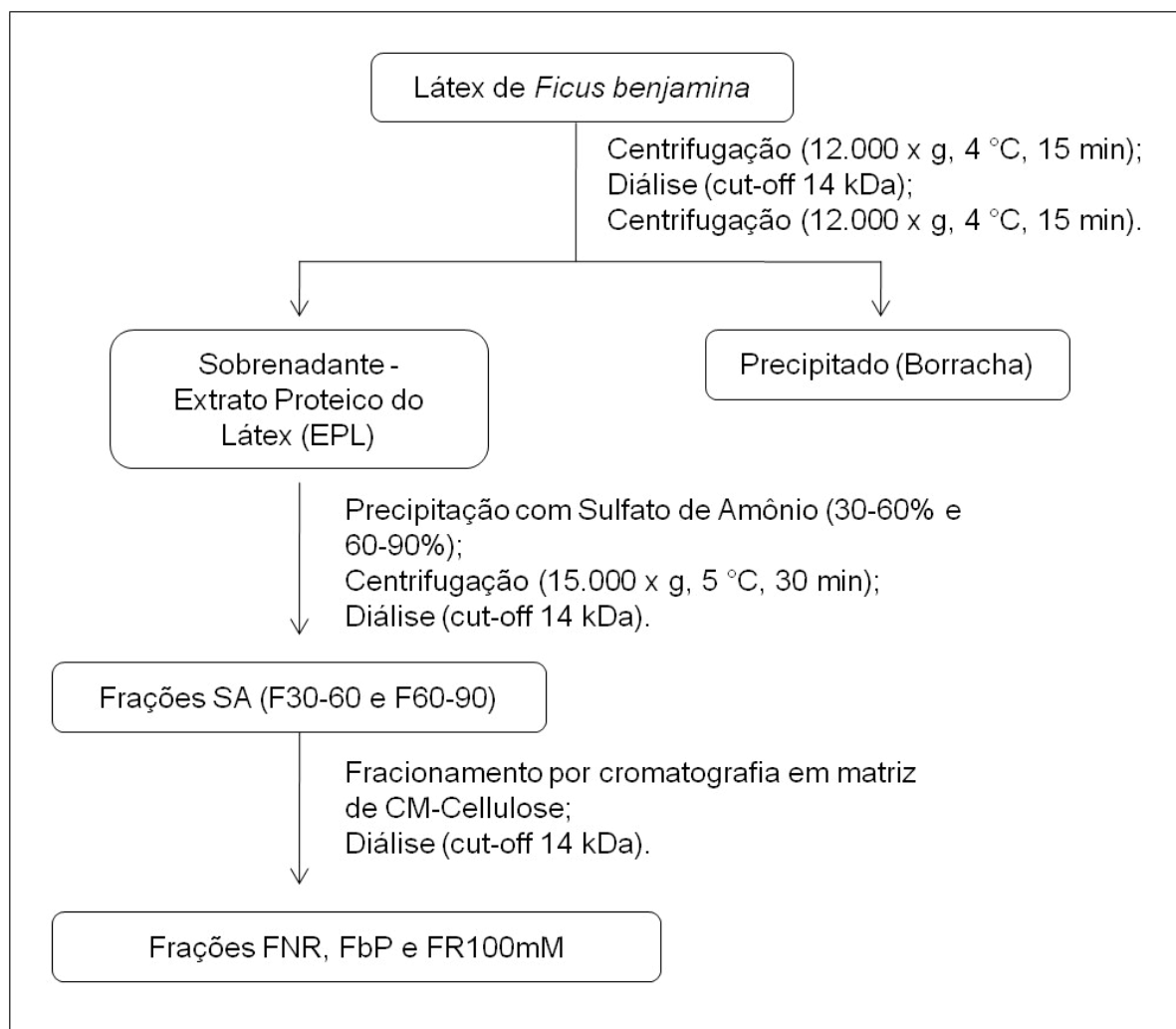
Material suplementar

Figura 1S. Obtenção do extrato do látex, das frações proteicas e da FbP a partir do látex de *Ficus benjamina*.

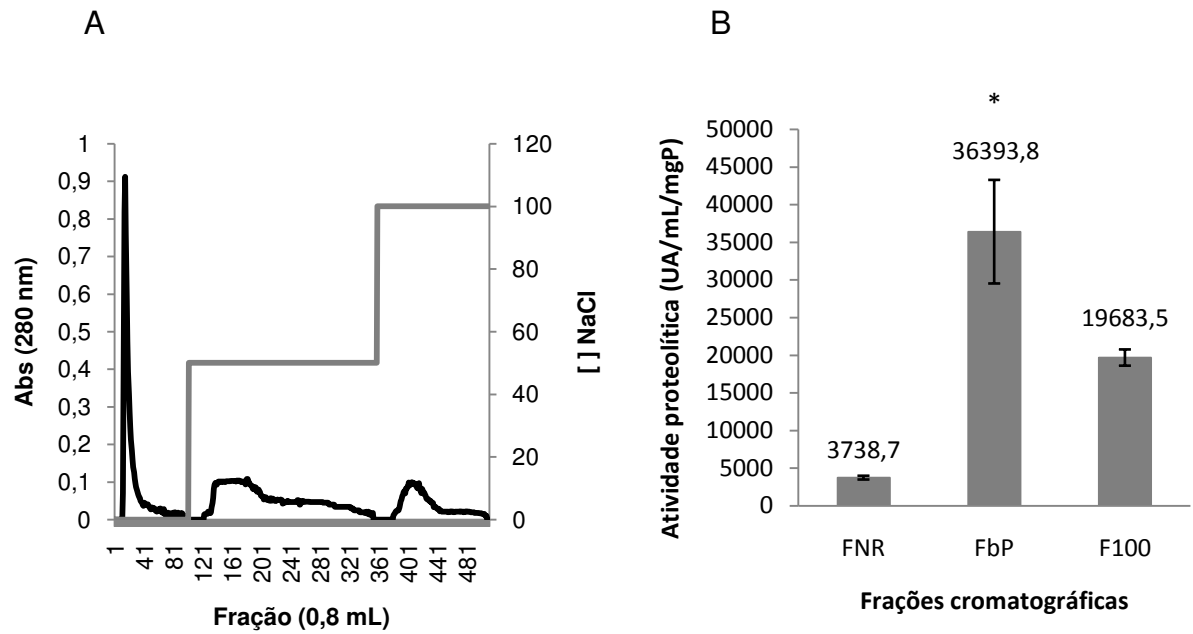


Figura 2S. Perfil de eluição da fração sulfato de amônio 60-90% em coluna de CM-Cellulose a um fluxo de 0,8 mL/min. As proteína retidas foram eluídas com 50 mM e 100 mM de NaCl e as frações foram denominadas FbP e F100, respectivamente, e a fração não retida foi nomeada FNR (A). Atividade proteolítica das frações cromatográficas (B). O asterisco indica maior atividade proteolítica entre as frações cromatográficas ($p \leq 0,05$).

CAPÍTULO IV – SHORT REPORT

Efeito antimicrobiano de protease cisteínica do látex de *Ficus benjamina*

Resumo

A atividade antimicrobiana de protease cisteínica e de extratos proteicos do látex de *Ficus benjamina* foi avaliada *in vitro* sobre as bactérias patogênicas *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* e *Enterobacter aerogenes*. O látex foi obtido por exsudação após incisão no ápice do galho das plantas. Para remoção da borracha, o material foi centrifugado, dialisado contra água, novamente centrifugado e, então, nomeado extrato proteico do látex (EPL). As frações de proteína foram obtidas por precipitação do EPL com sulfato de amônio nas saturações 30-60 e 60-90% para obtenção das frações F30-60 e F60-90, respectivamente. A fração de protease (FbP) foi obtida por fracionamento cromatográfico da F60-90 em matriz de CM-Cellulose. A atividade biológica foi avaliada por testes de inibição do crescimento bacteriano em meio líquido. A FbP mostrou efeito inibitório sobre o crescimento das bactérias *S. enterica* e *S. aureus* com concentração mínima de inibição (MIC) de 3,12 µg/mL para ambas as bactérias. Conclui-se que o látex de *F. benjamina* tem protease cisteínica com efeito inibitório sobre o crescimento das bactérias patogênicas podendo ser uma potencial alternativa para o controle das bactérias *S. enterica* e *S. aureus*.

Palavras-chave: Fitoterapia, proteína, antibacteriano, pecuária.

1. Introdução

A infecção dos animais de produção por agentes patogênicos tem importantes implicações, porque além de causarem diminuição na produtividade dos animais, esses microorganismos podem ser transmitidos ao homem através do consumo de produtos oriundos de animais contaminados (Chiu et al., 2004; Sharma et al., 2005).

Alimentos de boa qualidade e livres de microorganismos patogênicos tem se tornado uma exigência do mercado no mundo todo. No entanto, o surgimento de cepas multirresistentes aos princípios ativos dos medicamentos antibióticos tem dificultado o tratamento de infecções microbianas (Schwartz e Chaslus-Dancla, 2001).

A resistência bacteriana é uma realidade que atualmente se configura em uma das maiores preocupações para a medicina humana e veterinária. Esse fenômeno ocorre naturalmente, mas pode ter sido acelerado pela pressão seletiva com o uso indiscriminado e muitas vezes inadequado dos medicamentos (Witte, 2000; Arias e Carrilho, 2012). Se o controle microbiano é necessário para o sucesso da pecuária, ele deve ser feito de forma consciente, considerando-se os múltiplos aspectos que levam ao surgimento da resistência.

A busca por soluções eficazes para o controle de microorganismos tem impulsionado a pesquisa científica a identificar compostos de origem biológica que possam ser eficientes e ao mesmo tempo seguros para homens, animais e para o ambiente. A atividade antibacteriana de extratos vegetais é reportada para diferentes gêneros de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e bactérias multirresistentes (Al Akeel et al., 2014; N'guessan et al., 2007; Farooqui et al., 2015). No entanto, na maioria desses trabalhos a ação é atribuída aos compostos do metabolismo secundário das plantas.

Ficus é um gênero de plantas da família Moraceae com muitas espécies que são utilizadas na medicina popular para diversos fins terapêuticos (Ahmed e Urooj, 2010; Singh e Jaiswal, 2014). Recentemente, foi identificada em *Ficus drupacea* a presença de metabólitos com ação antibacteriana, antifúngica e anticâncer (Yessoufou, et al., 2015). Neste trabalho, avaliamos o potencial antibacteriano de constituintes proteicos do látex de *Ficus benjamina* sobre as bactérias patogênicas *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* e *Enterobacter aerogenes*.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção das proteínas solúveis do látex

O látex foi obtido a partir de plantas adultas encontradas no campus I da Universidade Federal do Maranhão, São Luís MA, Brasil (2°33'13.3"S

44°18'20.2"W). A exsicata do material vegetal foi depositada no Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão sob o número de registro 1457 no ano 2016. Após incisão no ápice do galho das plantas, o látex exsudado foi dissolvido em tampão fosfato de sódio (75 mM, pH 7,0) sempre mantido em banho de gelo. Para remoção da borracha, o látex foi centrifugado a 12.000 x g a 4 °C por 15 minutos, dialisado contra água (cut-off 14 kDa) e novamente centrifugado sob as mesmas condições anteriores. Depois do procedimento acima descrito, o sobrenadante obtido foi denominado extrato proteico do látex (EPL).

2.2. Determinação do teor de proteínas

As proteínas solúveis totais foram determinadas pelo método de Bradford (1976). Uma curva padrão foi construída com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA) para determinação da concentração protéica.

2.3. Fracionamento por precipitação com sulfato de amônio

As proteínas do EPL foram separadas em duas frações pela saturação com 30-60% e 60-90% de sulfato de amônio (SA) e nomeadas de F30-60 e F60-90, respectivamente. Em banho de gelo, o SA foi adicionado lentamente ao EPL e após a completa solubilização, a mistura permaneceu em descaso por 12 horas. A mistura foi centrifugada a 15.000 x g por 30 minutos a 5 °C. O precipitado foi ressuspendido e dialisado contra água para remoção do SA. O sobrenadante foi utilizado para a próxima saturação.

2.4. Obtenção da fração protease

A fração de protease cisteínica do látex de *F. benjamina* foi obtida pelo fracionamento cromatográfico da F60-90. A amostra proteica foi aplicada em uma coluna cromatográfica de troca iônica (matriz de CM-Cellulose) previamente equilibrada com tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,2) a um fluxo de 0,8 mL/min. A fração eluída com 50 mM de NaCl, denominada FbP, apresentou uma banda

proteica majoritária que foi identificada por espectrometria de massa como protease cisteínica com 23,97 kDa.

2.5. Ensaio de inibição do crescimento bacteriano

A atividade antibacteriana das frações proteicas e da FbP foi verificada de acordo o método de inibição de crescimento em meio líquido como descrito por Hancock (2000). A atividade antibacteriana foi avaliada para as bactérias Gram-negativas *Salmonella enterica subsp. enterica* sorovar Typhimurium (ATCC 14028) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) e a Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). As bactérias, previamente repicadas em meio de cultura ágar nutriente, foram transferidas para caldo Mueller-Hinton (5 mL) e incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Uma suspensão de células (D.O.600 nm = 0,08 e 0,1) com 105-106 UFC/mL foi utilizada no ensaio. O ensaio foi conduzido em placas de microtitulação (96 poços) através da adição da suspensão de células e amostra proteica (1:1, v/v) com um volume final de 0,2 mL. As concentrações utilizadas foram 50, 3,12 e 1,56 µg/mL. O controle negativo foi a água, meio no qual as amostras estavam dissolvidas. O crescimento foi avaliado por 4 horas a 37 °C.

3. Resultados e Discussão

Investigamos a propriedade antibacteriana do extrato, frações proteicas e da fração de protease cisteínica, FbP, obtidos do látex de *F. benjamina* sobre bactérias patogênicas que acometem animais de produção e que ocasionalmente podem ser transmitidas ao homem pelo consumo de alimentos contaminados.

Não observamos qualquer efeito aparente quando as três espécies foram submetidas à presença do extrato e das frações proteicas do látex nas concentrações testadas (Figura 1S). Essa observação pode ser explicada pela baixa concentração do princípio ativo em relação aos demais componentes dos extratos. Assim, a eficiência só pode ser observada quando testamos a FbP.

O crescimento da bactéria *S. enterica* na presença da FbP foi retardado em até 4 horas, exceto para a menor concentração (1,56 µg/mL) que a partir de 3 horas de

exposição teve crescimento bacteriano semelhante ao controle, no entanto, não observamos a relação dose dependência (Figura 1A).

O comportamento inibitório também foi observado para a bactéria *S. aureus*, mas nas primeiras horas essa bactéria mostrou-se muito sensível à FbP. Na presença de 50 µg/mL da FbP, o crescimento de *S. aureus* foi 100% reduzido até 3 horas e foi até 86% menor após 4 horas de exposição (Figura 1B). Na presença da menor concentração da FbP (1,56 µg/mL), o crescimento de *S. aureus* aumentou semelhante ao controle a partir de 4 horas de exposição, assim, consideramos 3,12 µg/mL a mínima concentração inibitória (MIC) para ambas as bactérias, *S. enterica* e *S. aureus*.

A bactéria *E. aerogenes* mostrou baixa sensibilidade à FbP. Após 4 horas de exposição, o crescimento bacteriano na presença das diferentes concentrações da FbP foi igual ao controle (Figuras 1C).

A literatura relata que extratos etanólicos de folhas adultas de *F. benjamina* inibem o crescimento das bactérias *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pyogenes* em concentrações a partir de 256 µg/mL (Reschke et al., 2007). Extratos de outras espécies do gênero, como *Ficus racemosa* (Mandal et al., 2000), *Ficus carica* (Aref et al., 2010) e *Ficus palmata* (Kumar et al., 2013) mostraram atividade bactericida sobre vários gêneros como *Echerichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Citobacter freundii*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus subtilis*. Gayathri e Kannabiran (2009) relataram que extratos aquosos de *F. benghalensis* exibem sinergismo com antibióticos na atividade antibacteriana sobre *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Klebsiella pneumonia*.

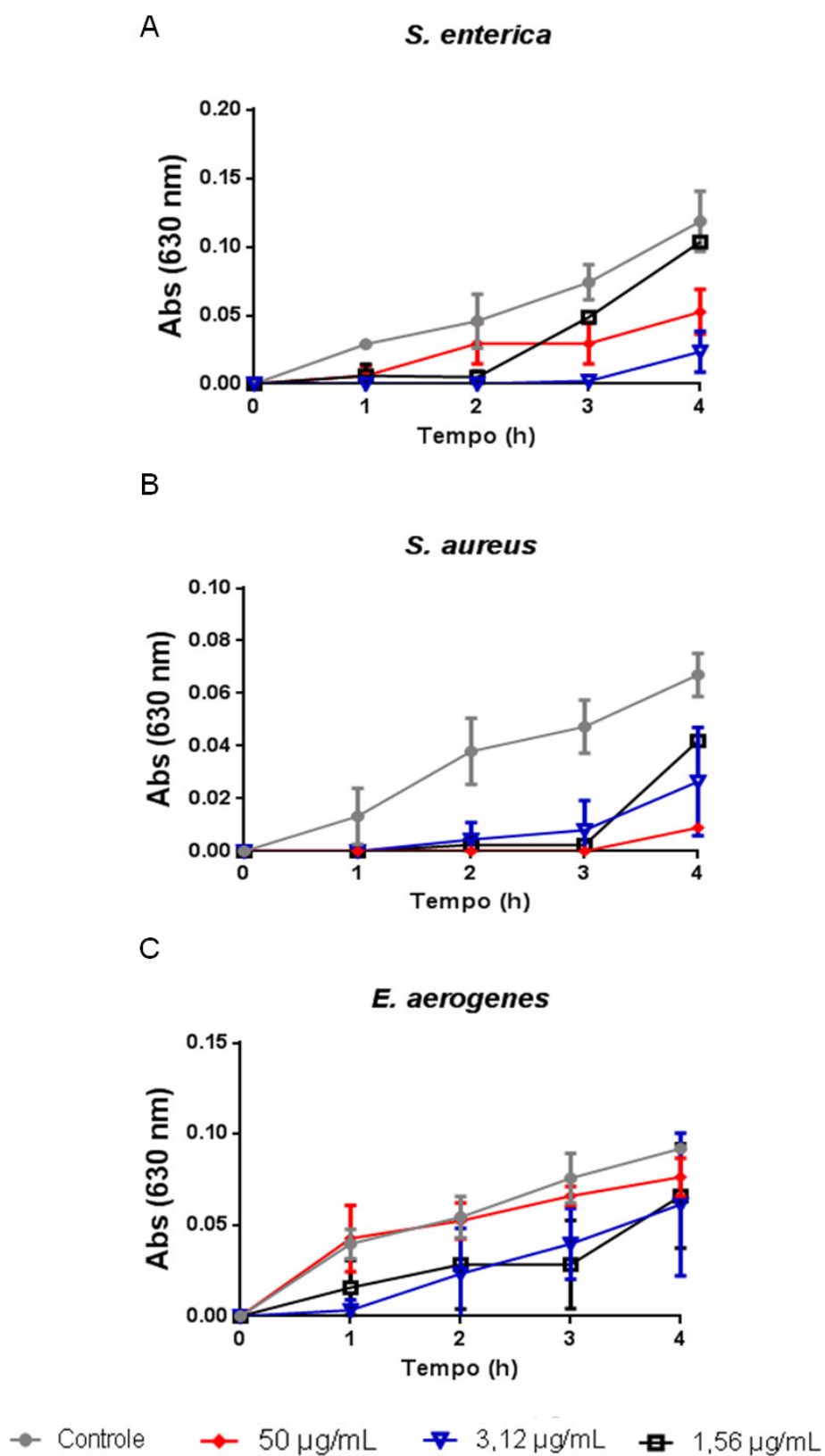


Figura 1. Crescimento das bactérias *Salmonella enterica* (A) *Staphylococcus aureus* (B) *Enterobacter aerogenes* (C) na presença de concentrações da FbP (*Ficus benjamina* Protease). Controle: meio de diluição das amostras (água).

Nos estudos supracitados a ação antibacteriana dos extratos foi atribuída aos compostos do metabolismo secundário das plantas. Mas na literatura também são encontrados alguns relatos de proteínas vegetais com propriedades antimicrobianas. Extratos proteicos de seis plantas medicinais foram demonstrados com grande capacidade de inibição no desenvolvimento das bactérias patogênicas *Proteus vulgaris*, *E. coli* e *S. aureus* (Al Akeel et al., 2014).

Frações proteicas do fruto de *Bromelia pinguin* inibiram o crescimento das bactérias *E. coli* e *S. aureus* com MICs de 0,35 mg/mL e 0,68 mg/mL, respectivamente. Os autores detectaram nas frações a presença de peptídeos, de atividade proteolítica e inibitória de protease, sugerindo que a atividade antibacteriana estivesse relacionada à presença desses compostos (Ruiz-Ruiz et al., 2016). A comparação desses resultados com os obtidos neste estudo revela que a MIC da FbP para *S. aureus* e *S. enterica* foi expressivamente menor (3,12 µg/mL).

Em um trabalho recente, a atividade antibacteriana de uma proteína purificada de sementes germinadas de *Bauhinia purpurea* foi verificada sobre diferentes gêneros de bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas. Os autores observaram que o tratamento com a proteína provocava ruptura da membrana celular e extravasamento do conteúdo citoplasmático (Sakthivel e Palani, 2016). Proteases são proteínas hidrolíticas, por isso, acreditamos que essa propriedade possa estar envolvida na atividade antibacteriana da FbP verificada neste estudo, possivelmente agindo sobre componentes proteicos da membrana celular.

Em conclusão, a protease cisteínica do látex de *F. benjamina* exerce efeitos inibitórios sobre o crescimento das bactérias *S. aureus* e *S. enterica* com MIC de 3,12 µg/mL. No entanto, entendemos que estudos posteriores devem ser realizados a fim de compreender os mecanismos envolvidos na atividade antibacteriana da protease.

Referências

Ahmed, F. and Urool, A. 2010. Traditional uses, medicinal properties, and phytopharmacology of *Ficus racemosa*: a review. *Pharmaceutical Biology* 48:672-681.

- Al Akeel, R.; Al-Sheikh, Y.; Mateen. A.; Syed, R.; Janardhan, K. and Gupta, V. C. 2014 Evaluation of antibacterial activity of crude protein extracts from seeds of six different medical plants against standard bacterial strains Saudi Journal of Biological Sciences 21:147–151.
- Aref, H. L.; Salah, K. B.; Chaumont, J. P.; Fekih, A.; Aouni, M. and Said, K. 2010. In vitro antimicrobial activity of four *Ficus carica* latex fractions against resistant human pathogens (antimicrobial activity of *Ficus carica* latex). Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences 23:53-58.
- Arias, M. V. B. and Carrilho, C. D. M. 2012. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? Semina: Ciências Agrárias 33:775-790.
- Araya, S.; Abera B. and Giday, M. 2015. Study of plants traditionally used in public and animal health management in Seharti Samre District, Southern Tigray, Ethiopia. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 11, 22. doi: 10.1186/s13002-015-0015-5.
- Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254.
- Chiu, C-H.; Su, L-H. and Chu, C. 2004. *Salmonella enterica* Serotype Choleraesuis: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Disease, and Treatment. Clinical Microbiology Reviews 17:311–322.
- De Pasquale, A. 1984. Pharmacognosy: the oldest modern science. Journal of Ethnopharmacology 11:1-16.
- Farooqui, A.; Khan, A.; Borghetto, I.; Kazmi, S.U.; Rubino, S. and Paglietti, B. 2015. Synergistic Antimicrobial Activity of *Camellia sinensis* and *Juglans regia* against Multidrug-Resistant Bacteria. PLoS ONE 10(2): e0118431. doi: 10.1371/journal.pone.0118431
- Gayathri, M. and Kannabiran, K. 2009. Antimicrobial activity of *Hemidesmus indicus*, *Ficus bengalensis* and *Pterocarpus marsupium* roxb. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 71: 578-581.
- Hancock, R. E. 2000. Cationic antimicrobial peptides: toward clinical applications. Expert Opinion on Investigational Drugs 9:1723-1729.

- Kumar, A.; Gularia, R. and Bhardwaj, A. 2013. Antibacterial screening of *Ficus palamata* Forsk. pure latex and its methanolic and ethanolic extracts. Indian Journal of Natural Products and Resources 4:371-374.
- Mandal, S. C.; Saha, B. P. and Pal, M. 2000. Studies on antibacterial activity of *Ficus racemosa* Linn. leaf extract. Phytotherapy Research 14:278-280.
- N'guessan, J. D.; Coulibaly, A.; Ramanou, A. A.; Okou, O. C.; Djaman, A. J. and Guédé-Guina, F. 2007. Antibacterial Activity of *Thonningia sanguinea* Against Some Multi-Drug Resistant Strains of *Salmonella enterica*. African Health Sciences 7:155– 158.
- Reschke, A.; Marques, L. M. and Mayworm, M. A. S. 2007. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 9:67-70.
- Ruiz-Ruiz, J. C.; Ramón-Sierra, J.; Arias-Argaez, C.; Magaña-Ortiza, D. and Ortiz-Vázquez, E. 2016. Antibacterial activity of proteins extracted from the pulp of wild edible fruit of *Bromelia pinguin* L. International Journal of Food Properties DOI:10.1080/10942912.2016.1154572 (in press).
- Sakthivel, M. and Palani, P. 2016 Isolation, purification and characterization of antimicrobial protein from seedlings of *Bauhinia purpurea* L. International Journal of Biological Macromolecules 86:390–401.
- Schwartz, S. and Chaslus-Dancla E. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. Veterinary Research 32:201-225.
- Sharma, R.; Sharma, C. L. and Kapoor B. 2005. Antibacterial resistance: current problems and possible solutions. Indian Journal of Medical Research 59:120–129.
- Silva, A. C. O. and Albuquerque, U.P. 2005. Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). Acta Botanica Brasilica 19:17-26.
- Singh, S. and Jaiswal, S. 2014. Therapeutic properties of *Ficus religiosa*. International Journal of Engineering Research and General Science 2: 149-158.
- Witte, W. 2000. Selective pressure by antibiotic use in livestock. International Journal of Antimicrobial Agents 16:19-24.
- Yessoufou, K.; Elansary, H. O.; Mahmoud, E. A. and Skalicka-Woźniak, K. 2015. Antifungal, antibacterial and anticancer activities of *Ficus drupacea* L. stem bark extract and biologically active isolated compounds. Industrial Crops and Products 74:752–758.

Material Suplementar

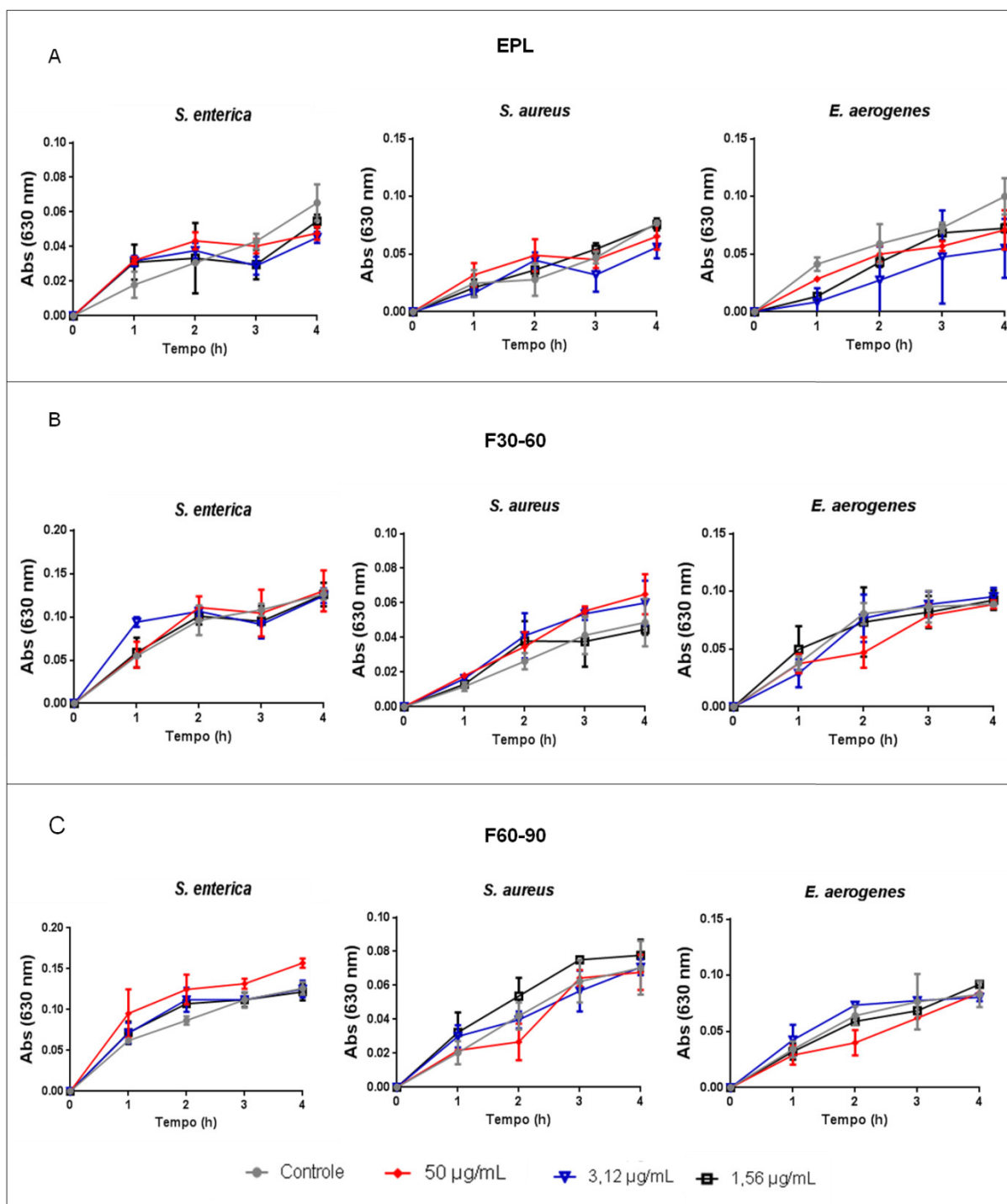


Figura 1S. Crescimento das bactérias *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* e *Enterobacter aerogenes* na presença de concentrações do extrato proteico do látex de *Ficus benjamina*, EPL (A); da fração obtida com a saturação do EPL com 30-60% de sulfato de amônio, a F30-60 (B); e da fração obtida com a saturação do EPL com 60-90% de sulfato de amônio, a F60-90 (C). Controle: meio de diluição das amostras (água).

CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção pecuária é largamente afetada pelo parasitismo por nematóides gastrointestinais e também por infecções provocadas por bactérias que causam perda de produtividade e consequente perda econômica. No contexto atual de resistência generalizada aos fármacos comumente utilizados, é necessário que a busca por novas moléculas bioativas seja contínua. Nesse aspecto, a prospecção de compostos bioativos provenientes de plantas, fungos e bactérias tem ganhado relevância na pesquisa científica com resultados bastante promissores.

O desenvolvimento de novos fármacos passa pela pesquisa basal de prospecção e avaliação *in vitro*. Neste estudo, demonstramos que as frações proteicas e a protease obtida a partir do látex de *F. benjamina* são capazes de inibir o desenvolvimento de larvas do nematóide gastrointestinal *H. contortus*. A protease também foi capaz de interferir negativamente no crescimento das bactérias patogênicas *S. aureus* e *S. enterica*.

Em conclusão, o látex de *F. benjamina* tem uma protease cisteínica com propriedades farmacológicas promissoras para o desenvolvimento de produtos que possam ser utilizados em programas de controle do nematóide gastrointestinal, *H. contortus* e das bactérias patogênicas *S. aureus* e *S. enterica*.

REFERÊNCIAS

AHMED, M.; LAING, M. D.; NSAHLAI, I. V. *In vivo* effect of selected medicinal plants against gastrointestinal nematodes of sheep. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 2, p. 411–417, 2014.

AHMED, M.; LAING, M. D.; NSAHLAI, I. V. In vitro anthelmintic activity of crude extracts of selected medicinal plants against *Haemonchus contortus* from sheep. **Journal of Helminthology**, v. 87, n. 2, p. 174–179, 2013.

ANDREOTTI, R.; NICODEMO, M. L. F. Uso de Antimicrobianos na Produção de Bovinos e Desenvolvimento de Resistência. Campo Grande: Embrapa, 2004. 55p. (Embrapa, Documentos, 144).

ARAÚJO, N. D. Morfoanatomia foliar de *Ficus* subg. *urostigma* (Gasp.) Miq. (Moraceae) de ocorrência na Paraíba e revisão etnomedicinal de *Ficus* L. para o Brasil. 2012. 71p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba.

BARRAU, E.; FABRE, N.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. Effect of bioactive compounds from sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the in vitro larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. **Parasitology**, v. 131, p. 531-538, 2005.

BRITO, G. L. Manejo sanitário voltado ao controle da mastite bovina. In: Cartilha para o produtor de leite de Rondônia. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2007, p.40.

CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**, Atheneu, São Paulo, 3 ed., p 229 – 234, 2002.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; MORAIS, S. M.; SANTOS, L. F. L.; ROCHA, M. F. G.; BEVILAQUA, C. M. L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.7, n.3, p.97-106, 2005.

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 em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2011.

CEDILLO, J.; KHOLIF, A. E.; SALEM, A. Z. M.; ELGHANDOUR, M. M. Y.; VÁZQUEZ, J. F.; ALONSO, M. U. BARBABOSA A. CHAGOYÁN J.C.V. REYNA A.G., 2015. Oral administration of Sauce llorón extract to growing lambs to control gastrointestinal nematodes and *Moniezia* spp. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 7, p. 520-525, 2015.

CLIMENI, B. S. O. ; MONTEIRO, M. V.; CICOTI, C. A.; NEVES, M. F. Hemoncose ovina. **Editora FAEF**. São Paulo, ano 11, n. 11, julho. 2008.

COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Doenças parasitárias em ruminantes no semi-árido brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 563-568, 2009.

ENDO, V. T.; OLIVEIRA, T. C.; CABRAL, A. P. M.; SAKAMOTO, C. A. M.; FERRARO, G. C.; PEREIRA, V.; LOPES, W. D. Z.; MAZZUCATTO, B. C. Prevalência dos helmintos *Haemonchus contortus* e *Oesophagostomum columbianum* em pequenos ruminantes atendidos no setor de Anatomia Patológica – UEM. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 1, n. 2, p. 112-118, 2014.

EVANGELOPOULOU, G.; KRITAS, S. CHRISTODOULOPOULOS, G.; BURRIEL A. R. The commercial impact of pig *Salmonella* spp. infections in border-free markets during an economic recession. **Veterinary World**, v. 8, n. 3, p. 257–272, 2015.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. *Staphylococcus aureus* intramammary infections and its implications in public health. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004.

FANKAM, A. G.; KUIATE, J. R.; KUETE, V. “Antibacterial and antibiotic resistance modifying activity of the extracts from *Allanblackia gabonensis*, *Combretum molle* and *Gladiolus quartianus* against Gram-negative bacteria Including multi-drug resistant phenotypes.” **BMC Complementary and Alternative Medicine** (2015) 15:206 DOI 10.1186/s12906-015-0726-0.

FAROOQUI, A.; KHAN, A.; BORGHETTO, I.; KAZMI, S. U.; RUBINO, S.; PAGLIETTI, B. Synergistic Antimicrobial Activity of *Camellia sinensis* and *Juglans regia* against Multidrug-Resistant Bacteria. **PLoS ONE**, 2015; 10(2): e0118431.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDREL, R. E. Bactericidal Activities of Plant Essential Oils and Some of Their Isolated Constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 10, p. 1545–1560, 2002.

GATONGI, J. M.; NJOROGI, J. M.; SCOTT, M. E.; RANJAN, S.; GATHUMA, J. M.; MUNYUA, W. K.; CHERUIYOT, H.; PRICHARD, R. K. Susceptibility to IVM in a field strain of *Haemonchus contortus* subjected to four treatments in a closed sheep–goat flock in Kenya. **Veterinary Parasitology**, v.110, n. 3-4, p. 235-240, 2003.

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

GIRÃO, E. S.; GIRÃO, R. N.; MEDEIROS, L. P. Verminose em ovinos e seu controle. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 1998. 19 p. (Embrapa Meio-Norte, Circular Técnica, 19).

GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 308-320, 2006.

HANSSON, A.; VELIZ, G.; NAQUIRA, C.; AMREN, M.; ARROYO, M.; AREVALO, G. Preclinical and clinical studies with latex from *Ficus glabrata* HBK, a traditional intestinal antihelmintic in the Amazonian area. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 105-138, 1986.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, 1994.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Anuário Estatístico 2014**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 30 de julho de 2016.

JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1994. 804p.

KRYCHAK-FURTADO, S.; NEGRELLE, R. B.; MIGUEL, O. G.; ZANIOLO, S. R.; KAPRONEZAI, J.; RAMOS, S. J.; SOTELLO A. Efeito de *Carica papaya* L. (Caricaceae) e *Musa paradisiaca* Linn (Musaceae) sobre o desenvolvimento de ovos de nematódeos gastrintestinais de ovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 2, p. 191-197, 2005.

KUMAR, A.; GULARIA, R.; BHARDWAJ, A. Antibacterial screening of *Ficus palmata* Forsk. pure latex and its methanolic and ethanolic extracts. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 4, n. 4, p. 371-374, 2013.

LANGONI, H.; SILVA, A. V.; CABRAL, K. G. Aspectos etiológicos na mastite bovina. Flora bacteriana aeróbica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, n. 5, p. 204-210, 1998.

LAX, A. J.; BARROW, P. A.; JONES, P. W.; WALLIS, T. S. Current Perspectives in Salmonellosis. **British Veterinary Journal**, v. 151, n. 4, p. 351 – 377, 1995.

LE JAMBRE, L. F. Relationship of blood loss to worm numbers, biomass and egg production in *Haemonchus contortus* infected sheep. **Internacional Journal Parasitology**, 25, 269-273, 1995.

LEVECKE, B.; BUTLLE, D.; BEHNKE, J. M.; DUCE, I. R.; VERCRUYSSSE, J. Cyteine proteinases from papaya (*Carica papaya*) in the treatment of experimental *Trichuris suis* infection in pigs: two randomized controlled trials. **Parasites e Vectors**, 2014, 7:255 doi: 10.1186/1756-3305-7-255.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; TORRES, M. A. V.; BACHER, L. B. 2003. Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 368p.

MACEDO, I.T.; DE OLIVEIRA, L. M.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L.; RIBEIRO, W. L.; DOS SANTOS, J. M.; DE MORAIS, S. M.; DE PAULA, H. C.; BEVILAQUA, C. M. In vitro effects of *Coriandrum sativum*, *Tagetes minuta*, *Alpinia zerumbet* and *Lantana camara* essential oils on *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veteterinária**, v. 22, n. 4, p. 463-469, 2013.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 28 de agosto de 2016.

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L.; SELAIVE, A. V.; GIRÃO, M. D. Resistência a anti-helmínticos em nematóides gastrintestinais de ovinos e caprinos, no município de Pentecoste, estado do Ceará. **Ciência Animal**, v. 8, n. 1, p. 7-11, 1998.

MIKULÁŠOVÁ, M.; CHOVANOVÁ, R.; VAVERKOVÁ, S. Synergism between antibiotics and plant extracts or essential oils with efflux pump inhibitory activity in coping with multidrug-resistant staphylococci. **Phytochemistry Reviews**, v.15, n.4, p. 651–662, 2016.

MINHO, A. P. ENDOPARASITASES DE OVINOS: Conhecer para Combater. Bagé: Embrapa, 2014. 19p. (Embrapa, Circular Técnica, 45).

MOLAN, A. L.; MEAGHER, L. P.; SPENCER, P. A.; SIVAKUMARAN, S. Effect of flavan-3-ols on in vitro egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 14, p. 1691-1698, 2003.

MOLENTO, M.B.; TASCA, C.; GALLO, A., FERREIRA, M.; BONONI, R.; STECCA, E. Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em Pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p.1139-1145, 2004.

MOTA, H. R. O. **Identificação de proteínas de defesa vegetal com importância biotecnológica presentes no látex de *Ficus benjamina* L.** 2013. 66p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Cará, Ceará.

NCUBE, B.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. *In vitro* antimicrobial synergism within plant extract combinations from three South African medicinal bulbs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 81-89, 2012.

N'GUESSAN, J. D.; COULIBALY, A.; RAMANOU, A. A.; OKOU, O. C.; DJAMAN, A. J.; GUÉDÉ-GUINA, F. Antibacterial activity of *Thonningia sanguinea* against some multi-drug resistant strains of *Salmonella enterica*. **African Health Sciences**, v. 7, n. 3, p. 155-158, 2007.

OLIVEIRA, L. D. R. Plantas medicinais como alternativa para o controle de *Haemonchus contortus* em ovinos: testes in vitro e in vivo. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2013.

PERRY, B. D.; RANDOLPH, T. F.; MCDERMOTT, J. J.; SONES, K. R.; THORNTON, P. K. Investing in animal health research to alleviate poverty. Nairobi, Kenya: International Livestock Research Institute, 2002. 148 p.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. Vencendo a luta contra a mastite. Naperville, IL: Westfalia, Surge Ing, 2000. 192p.

PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; SOBRINHO, E. M.; ALMEIDA, A. C.; MARTINS, E. R. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 326-331, 2012.

POMROY, W. E. Anthelmintic resistance in New Zealand: a perspective on recent findings and options for the future. **The New Zealand Veterinary Journal**, v. 54, n. 6, p. 265-270, 2006.

RANJAN, R.; SWARUP, D.; PATRA, R. C.; NANDI, D. Bovine Protothecal mastitis: a review. **Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v.1, n.17, p.1-7, 2006.

RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.

RODRIGUES, A. B.; ATHAYDE, A. C. R.; RODRIGUES, O. G.; SILVA, W. W.; FARIA, E. B. Sensibilidade dos nematóides gastrintestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 4, p.162-166, 2007.

SANTA ROSA, J. Enfermidades em caprinos: diagnóstico, patogenia, terapêutica e controle. Brasília: Embrapa-SPI; Sobral: Embrapa-CNPC, 1996. 220p

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. 1ªed. Barueri: Manole, 2007. p.314.

SEO, K. H.; HOLT, P. S.; GAST, R. K.; HOFACRE, C. L. Elimination of Early Salmonella enteritidis infection after treatment with competitive-exclusion culture and enrofloxacin in experimentally infected chicks. **Poultry Science**, v. 79, n. 10, p.1408-1413, 2000.

SISSAY, M. M.; ASEFA, A.; UGGLA, A.; WALLER, P. J. Anthelmintic resistance of nematode parasites of small ruminants in eastern Ethiopia: Exploitation of refugia to restore anthelmintic efficacy. **Veterinary Parasitology**, v.135, n. 3-4, p.337-346, 2006.

SOUZA, W. H. O agronegócio da caprinocultura de corte no Brasil. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.1, n.1, p. 51-58, 2007.

STEAR, M. J.; MURRAY, M. Genetic resistance to parasitic disease: particularly of resistance in ruminants to gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 54, n. 1-3, p. 161-176, 1994.

STEPEK, G.; LOWE, A. E.; BUTTLE, D. J.; DUCE, I. R.; BEHNKE, J. M. Anthelmintic action of plant cysteine proteinases against the rodent stomach nematode, *Protospirura muricola*, in vitro and in vivo. **Parasitology**, v. 134, n. 1, p. 103-112, 2007.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. Veterinary parasitology. Philadelphia: Willey-Blackwell, 2007. 600p

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 493-499, 2001.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F. P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E. A.; MILCZEWSKI, V.; MOCELIN, G.; SILVA, M. C. P. Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 1, p. 41-47, 2004.

VIEIRA, L. S. **Endoparasitoses gastrintestinais em caprinos e ovinos**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2005.

VLASSOFF, A.; LEATHWICK, D. M.; HEATH, A. C. G. The epidemiology of nematode infections of sheep. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 49, n. 6, p. 213-221, 2001.

YARMOLINSKY, L.; ZACCAI, M.; BEN-SHABAT, S.; MILLS, D.; HULEIHEL, M. Antiviral activity of ethanol extracts of *Ficus binjamina* and *Lilium candidum* in vitro. **New Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 307-313, 2009.

YESSOUFOU, K.; ELANSARY, H. O.; MAHMOUDD E. A.; SKALICKA-WOŹNIAK, K. Antifungal, antibacterial and anticancer activities of *Ficus drupacea* L. stem bark extract and biologically active isolated compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 752-758, 2015.

YONDO, J.; KOMTANG, M. C.; WABO, J. P.; BILONG C. F. B.; KUIATE, J. R.; MPOAME, M. Nematicidal efficacy of methanol/methylene chloride extract of *Rauwolfia vomitoria* (Apocynaceae) on *Heligmosomoides bakeri* (Nematoda, Heligmosomatidae) parasite of the white mouse (*Mus musculus*). **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 7, n. 34, p. 3220-3225, 2013.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF**, v. 345, p.15-18, 1999.