

EFEITO DE ALBUMINAS 2S DE PLANTAS OLEAGINOSAS SOBRE OS
NEMATOIDES *PANAGRELLUS* SPP E GASTRINTESTINAIS DE
OVINOS

JULIANA SILVA RIBAS

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF

Campos dos Goytacazes - RJ

Dezembro – 2019

EFEITO DE ALBUMINAS 2S DE PLANTAS OLEAGINOSAS SOBRE OS
NEMATOIDES *PANAGRELLUS* SPP E GASTRINTESTINAIS DE
OVINOS

JULIANA SILVA RIBAS

Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

Campos dos Goytacazes - RJ

Dezembro – 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

R482

Ribas, Juliana Silva.

Efeito de Albuminas 2S de Plantas Oleaginosas sobre os Nematoides *Panagrellus* spp e Gastrintestinais de Ovinos / Juliana Silva Ribas. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

65 f. : il.

Bibliografia: 56 - 65.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2020.

Orientador: Clovis de Paula Santos.

Coorientadora: Olga Lima Tavares Machado.

1. Albumina 2S de oleaginosas. 2. Efeito nematicida. 3. Nematoides gastrointestinais de ovinos. 4. Alterações ultraestruturais. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

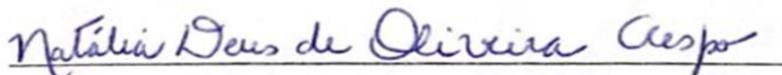
EFEITO DE ALBUMINAS 2S DE PLANTAS OLEAGINOSAS SOBRE OS
NEMATÓIDES *PANAGRELLUS* SPP E GASTRINTESTINAIS DE
OVINOS

JULIANA SILVA RIBAS

Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 19/12/2019

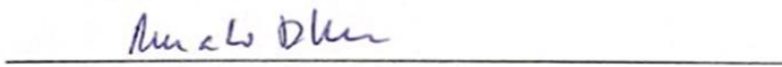
Comissão examinadora:



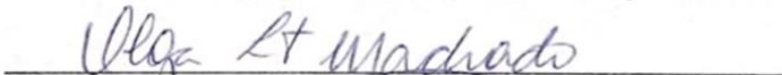
Dr^a. Natália Deus de Oliveira Crespo (Dr^a. Biociências e Biotecnologia) – IFF



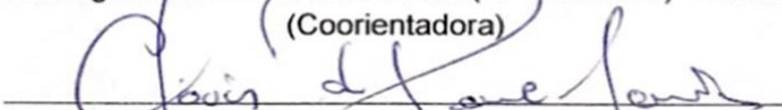
Dr. Francimar Fernandes Gomes (Dr. Ciência Animal) – UENF



Dr. Renato Augusto DaMatta (Dr. Ciências) – UENF



Dr^a. Olga Lima Tavares Machado (Dr^a. Ciências) – UENF
(Coorientadora)



Dr. Clóvis de Paula Santos (Dr. Méd.Vet. Parasitologia Veterinária) – UENF
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por ter me guiado e dado forças para mais esta etapa da minha vida.

A toda minha família, em especial aos meus pais Joaquim e Lia, por tanto amor, dedicação, incentivo e compreensão, obrigada por estarem ao meu lado para tudo, por todo esforço em minha educação, por me ensinarem os valores da vida e serem meus maiores exemplos. A minha irmã Mariana, que mesmo de longe sempre esteve presente torcendo e acreditando em mim.

Aos professores Dr. Clóvis de Paula Santos por todos os ensinamentos durante esse tempo, pela paciência e compreensão, à Dr^a. Olga Lima Tavares Machado pela inspiração, força e exemplo de dedicação, por ter me acolhido e ensinado tudo o que pode.

Ao revisor deste trabalho, Dr. Deivid França Freitas pela atenção e dedicação dispensada nesta revisão.

Aos membros da banca, Dr^a. Natália Deus de Oliveira Crespo, Dr. Francimar Fernandes Gomes e Renato Augusto DaMatta pela atenção e disponibilidade.

As técnicas do LBCT Adriana Alves, Beatriz Ferreira, Giovana Alves, os funcionários da unidade experimental (curral) da UENF e a todos que contribuíram nas etapas experimentais com dedicação e empenho, em especial a Dr^a. Letícia Oliveira pela disposição em me ajudar na obtenção das imagens no microscópio de transmissão.

As meninas do LQFPP Jucélia Araújo, Raquel Braga, Francianne Galossi, Tatiana Moraes, Mariana Giarola e Débora Mothé meu especial agradecimento, obrigada pelo apoio, incentivo, troca de conhecimento, companheirismo nos momentos difíceis, boas risadas nos momentos de descontração, foram tantas experiências juntas que só me enriqueceram.

A todos os meus amigos de Carangola e os que ganhei em Campos, em especial a Giselle que sempre esta ao meu lado e tanto me incentivou na decisão de fazer o mestrado, obrigada por tanta troca, apoio e orações nesse tempo.

Aos professores, funcionários e a todos os colegas do LBCT e LQFPP, pelos ensinamentos, contribuição e convivência. Ao professor Dr. Arnaldo Rocha Façanha pelas palavras de apoio e incentivo fundamental para finalização deste trabalho.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade e por ter me proporcionado condições para a realização deste trabalho. A Faperj, a UENF e a Capes, pelo apoio financeiro concedido ao longo deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos a todos que direta ou indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho.

RESUMO

A crescente resistência anti-helmíntica estimula a busca de abordagens alternativas ao controle tradicional de nematoides baseado no uso de fármacos comerciais. Entre as alternativas de controle, nota-se o crescente uso de substâncias bioativas oriunda de plantas. Dentre estas, destaca-se a proteína albumina 2S com comprovada atividade fungicida e bactericida, além do efeito inibitório em enzimas digestivas. Dado a ausência de estudos avaliando o potencial nematicida desta proteína, objetivou-se investigar o possível efeito da albumina 2S de oleaginosas sobre larvas de vida livre e larvas infectantes (L₃) de nematoides gastrintestinais de ovinos. Para tal, foi realizada extração de proteínas albumina 2S de sementes de mamona, pinhão-manso e crambe por cromatografia de exclusão molecular seguido de caracterização das frações isoladas. Os testes de atividade biológica das larvas foram realizados com as albuminas 2S em diferentes concentrações por 48h. Em seguida, a viabilidade das larvas foi quantificada e as mesmas, processadas para análise por microscopia eletrônica de varredura a fim de verificar as alterações ultraestruturais. Albuminas 2S isoladas apresentaram massas moleculares entre 12 e 17 kDa e aquelas extraídas de mamona ou pinhão-manso ocasionaram a morte das larvas L₃ e dos *Panagrellus* spp. respectivamente. Alterações na ultraestrutura das fibras musculares, descontinuidade do tegumento e aumento do número de vacúolos por células foram observados nos tratamentos com amostras de L₃ usadas que tiveram efeito. Assim, demonstrou-se que as albuminas 2S possuem efetiva atividade nematicida demonstrando seu potencial uso contra larvas de nematoides gastrintestinais de ovinos e larvas de *Panagrellus* spp.

Palavras-chave: Albumina 2S de oleaginosas. Efeito nematicida. Nematoides gastrintestinais de ovinos. Alterações ultraestruturais.

ABSTRACT

The increasing anthelmintic resistance stimulates the search for alternative approaches to traditional nematode control based on the use of commercial drugs. Among the control alternatives, there is a growing use of bioactive substances from plants. Among these, the protein albumin 2S stands out with proven fungicidal and bactericidal activity, in addition to the inhibitory effect on digestive enzymes. Given the absence of studies evaluating the nematicidal potential of this protein, the objective was to investigate the possible effect of oilseed 2S albumin on free-living larvae and infectious (L₃) larvae of gastrointestinal nematodes in sheep. For this purpose, extraction of 2S albumin proteins from castor, jatropha and crambe seeds was carried out by molecular exclusion chromatography followed by characterization of the isolated fractions. The biological activity tests of the larvae were carried out with 2S albumin in different concentrations for 48 hours. Then, the larvae viability was quantified and processed for analysis by scanning electron microscopy in order to verify the ultrastructural changes. Isolated 2S albumins presented molecular masses between 12 and 17 kDa and those extracted from castor or jatropha caused the death of L₃ larvae and *Panagrellus* spp. respectively. Changes in the ultrastructure of muscle fibers, discontinuity of the integument and an increase in the number of vacuoles per cell were observed in treatments with used L₃ samples that had an effect. Thus, it was demonstrated that 2S albumin has effective nematicidal activity, demonstrating its potential use against larvae of gastrointestinal nematodes in sheep and larvae of *Panagrellus* spp.

Keywords: 2S albumin from oilseeds. Nematicidal effect. Gastrointestinal nematodes of sheep. Ultrastructural changes.

LISTA DE FIGURAS/ TABELAS

Tabela 1 - Espécies de nematoides gastrintestinais de ovinos, habitat, período pré-patente	20
Figura 1 - Estrutura geral do corpo do nematoide	18
Figura 2 - Ciclo de vida generalizado dos principais nematoides gastrintestinais de ovinos transmitidos ao hospedeiro via ingestão das larvas infectantes (L ₃)	22
Figura 3 - Frutos e folhas da mamona	26
Figura 4 - Sementes de mamona	26
Figura 5 - Frutos de pinhão-manso	28
Figura 6 - Sementes de pinhão-manso	29
Figura 7 – Inflorescência do Crambe	30
Figura 8 - Sementes de crambe	31
Figura 9 – Perfil cromatográfico da filtração em gel (Sephadex G-50) do extrato bruto das sementes de mamona (A), pinhão-manso (B) e crambe (C)	42
Figura 10 - Perfil cromatográfico de albumina 2S de sementes de mamona (A), pinhão-manso (B) e crambe (C) após cromatografia em coluna de fase reversa C18, sistema HPLC	43
Figura 11 - Perfil proteico das frações G-50 (A) e mesmo perfil após transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose e coradas com Ponceau (B)	44
Figura 12 - Perfil proteico por Western Blotting das frações albumina 2S de mamona, crambe e pinhão-manso	44
Figura 13 - Número de <i>Panagrellus</i> spp. sobreviventes no controle e com diferentes concentrações 0,04; 0,4 e 2 µg/ µL de albumina 2S de mamona após 48 horas de cultivo a 25° C	45
Figura 14 - Número de larvas (L ₃) sobreviventes no controle e com diferentes concentrações de albumina 2S de mamona após 48 horas de cultivo a 25° C	46

Figura 15 - Ultraestrutura por M.E.T. das larvas (L ₃) de nematoides gastrintestinais de ovinos não tratada e tratada com albumina 2S de mamona	47
Figura 16 - Número de larvas (L ₃) sobreviventes no controle e com diferentes concentrações de albumina 2S de crambe após 48 horas de cultivo a 25° C	48
Figura 17- Número de larvas (L ₃) sobreviventes no controle e com concentrações de 6 e 10 µg/ µl de PBS a 0,01%	48
Figura 18- Larvas (L ₃) tratadas e não tratadas com albumina 2S de crambe após 48 horas de cultivo a 25° C	49
Figura 19- Ultraestrutura por M.E.T. das larvas (L ₃) de nematoides gastrintestinais de ovinos não tratada e tratada em meio com albumina 2S de crambe com tampão PBS 0,01%	50
Figura 20- Número de larvas (L ₃) sobreviventes no controle e com diferentes concentrações de Albumina 2S de pinhão-manso após 48 horas de cultivo a 25° C	51

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BCA	Ácido Bicinconínico
BSA	<i>Albumina</i> sérica bovina
CTL	Controle
DAB	Diaminobenzidina
GA	Glutaraldeído
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
kDa	KiloDalton
L ₁	Larva de 1° estágio
L ₂	Larva de 2° estágio
L ₃	Larva de 3° estágio (larva Infectante)
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
OPG	Ovos de nematoides por grama de fezes
PA	Paraformaldeído
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato salino
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
TCaCO	Tampão CaCodilato de Sódio
TFA	Ácido trifluoracético
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. Ovinocultura	17
2.2. Características gerais dos nematoides	17
2.3. Nematoides de ruminantes	19
2.4. Ciclo de vida dos nematoides gastrintestinais em ovinos	22
2.5. Resistencia anti-helmíntica	23
2.6. Albuminas 2S	24
2.7. Espécies oleaginosas.....	25
2.7.1. Mamona.....	25
2.7.2. Pinhão-manso.....	28
2.7.3. Crambe.....	30
2.8. Nematóide de vida livre (<i>Panagrellus</i> spp.).....	32
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. Objetivo Geral	34
3.2. Objetivos Específicos	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. Obtenção das sementes	35
4.2. Extração de Proteínas.....	35
4.2.1. Mamona.....	35
4.2.2. Pinhão-manso.....	35
4.2.3. Crambe	36
4.3. Fracionamento de Proteínas	36
4.3.1. Cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-50)	36
4.3.2. Cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-25)	37
4.3.3. Cromatografia de fase reversa em coluna C18	37
4.4. Quantificação e caracterização das proteínas isoladas	37
4.4.1. Dosagem de proteínas	37
4.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	37
4.4.3. Western Blotting	38
4.5. Ensaio Biológico.....	39
4.5.1. Obtenção das larvas (L ₃) de nematoides gastrintestinais.....	39

4.5.2.	Cultivo e manutenção de nematoides de vida livre.....	39
4.6.	Ensaio de atividade biológica.....	40
4.6.1.	Atividade biológica de albumina 2S contra nematoides gastrointestinais	40
4.6.2.	Ensaio com albumina 2S de mamona em <i>Panagrellus</i> spp.....	40
4.7.	Avaliação das alterações ultraestruturais.....	40
4.8.	Análise estatística	41
5.	RESULTADOS	42
5.1.	Perfil cromatográfico (Filtração em gel).....	42
5.2.	Perfil cromatográfico (Fase reversa HPLC).....	43
5.3.	Homogeneidade das frações (SDS-PAGE).....	43
5.4.	Imunodeteção das albuminas 2S (Western blotting)	44
5.5.	Atividade nematicida de albumina 2S sobre nematoides	45
5.5.1.	Albumina 2S de mamona	45
5.5.2.	Albumina 2S de crambe	47
5.5.3.	Albumina 2S de pinhão-manso	51
6.	DISCUSSÃO.....	52
7.	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

Nematoides gastrintestinais constituem-se o principal problema sanitário dos rebanhos de ovinos em função do efeito do parasitismo nos animais e gastos para o seu controle que limita consideravelmente o aproveitamento econômico destes animais. A infecção por parasitas gastrintestinais representa a mais importante fonte de prejuízos para criadores de ovinos em várias regiões (JUNIOR, 2016).

O parasitismo gastrintestinal pode ser verificado no aspecto sanitário, sobre diversos efeitos decorrentes que podem se apresentar sob a forma aguda, levando os animais subitamente à morte ou sob a forma crônica, em que os danos podem ser gradativamente notados, dentre os quais um menor escore corporal, perda de peso, redução na produção e na qualidade de lã, ineficiência reprodutiva, reduzida resistência a enfermidades e elevado índice de mortalidade, principalmente entre os animais jovens (FAO, 2003; SCZESNY-MORAES et al., 2010; JUNIOR, 2016). Este problema se agrava na pecuária ovina, pois se observa uma exploração mais intensiva do rebanho, com o aumento do número de animais confinados por hectare o que acarreta diversos problemas sanitários (COSTA, 2007).

De forma geral, o controle parasitário dos animais de produção se baseia quase exclusivamente no uso de compostos anti-helmínticos (REIS, 2004). A resistência anti-helmíntica se tornou um dos principais fatores para o aumento das nematodioses ovina que é definida como um aumento significativo no número de espécimes observadas em uma dada população, e que são capazes de suportar doses elevadas de um dado composto químico que tenha comprovação letal para a maioria dos indivíduos de uma mesma população normalmente sensível (VIEIRA, 2004).

No Brasil têm-se evidenciado nas últimas décadas, um aumento no número de publicações com o tema resistência anti-helmíntica, sendo o primeiro trabalho publicado desde a década de 1960 em ovinos no estado do Rio Grande do Sul (SALGADO; SANTOS, 2016). Não obstante, o país acumula o maior número de relatos de resistência anti-helmíntica em pequenos ruminantes nas Américas (TORRES-ACOSTA et al., 2012).

Na região Norte e Noroeste do estado do Rio de Janeiro, Cruz et al. (2010) verificaram a resistência estabelecida em diferentes localidades, entretanto,

evidenciou-se a falta de conhecimento dos proprietários diante do problema e suas eventuais soluções. Salgado; Santos (2016), em outro estudo no estado Rio de Janeiro, observaram a existência de uma alta proporção de resistência anti-helmíntica a múltiplas drogas e gêneros parasitários nos rebanhos analisados. Sendo este fato justificado pelas falhas no manejo como o tratamento de todos os animais, falta de critério de avaliação clínica ou laboratorial e rotação rápida de bases anti-helmínticas.

O controle integrado dos nematoides adota um conjunto de medidas estratégicas que visam reduzir a infecção dos animais, contaminação dos pastos e manutenção da eficácia dos compostos anti-helmínticos (COSTA; SIMÕES; RIET-CORREA, 2010). Neste sentido, algumas medidas estão disponíveis como o manejo do rebanho e de pastagens, pastoreio rotacionado, descontaminação prévia das pastagens, pastoreio com alternância de categorias e ou espécies de hospedeiros ao passo que outras estão ainda em pesquisa como uso de fungos nematófagos, seleção genética, nutrição, vacinas e fitoterapia (CEZAR; CATTO; BIANCHIN, 2008). Recentemente, uma empresa Australiana lançou o produto Bioworma que contem o fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* como princípio ativo, no qual o fungo constrói uma rede microscópica que captura, paralisa e consome os estádios juvenis (larvas) de nematoides gastrintestinais. Quando os animais são alimentados com os esporos de *D. flagrans* estes passam pelo sistema digestivo e caem ao solo juntamente com as fezes, onde são estimuladas quando as larvas se tornam ativas (BIOWORMA, 2019).

Dentre as diversas substâncias provenientes de oleaginosas a serem investigadas para tratamento de helmintoses estão às albuminas 2S que podem ser encontradas na mamona (*Ricinus communis* L.), pinhão-manso (*Jatropha curcas*) e no crambe (*Crambe abyssinica Hochst*). Estudos apontam o possível potencial nematocida de substâncias da mamona (*Ricinus communis*), que vem sendo utilizada no tratamento anti-helmíntico dos habitantes da ilha de Marajó (MOTEIRO, 2010; MONTEIRO; RODRIGUES; CAMURÇA-VASCONCELOS, 2012), além de estudos no controle de fitonematoides em diversas culturas (JAEHN; LAMBERT, 1984; LORDELLO; SABINO, 1985; MASHELA; NTHANGENI, 2002). Em estudos realizados com pinhão-manso (KOSMANN et al., 2014) e crambe (BORGES et al. 2012) demonstram que estas plantas apresentam-se resistentes a nematoides das

galhas, que afetam o sistema radicular, entretanto, a correlação desta proteína ao seu papel no controle dos nematoides não tem sido avaliado.

As albuminas 2S são proteínas de reserva presentes em dicotiledôneas, encontradas nas sementes, nos frutos e no pólen destas plantas e que podem, adicionalmente as funções de reserva, e de defesa, desempenhar outras funções como emulsificador (BURNETT et al., 2002), inibidor de enzimas digestivas (MARIA-NETO et al., 2011; SOUZA et al., 2016), atividades microbidas (SOUZA et al., 2016) e antifúngicas (AGIZZIO et al., 2003; RIBEIRO et al., 2012; RIBEIRO et al., 2011).

Diante as diferentes funções desempenhadas pelas albuminas 2S faz-se importante determinar a existência da atividade biológica desta proteína em nematoides dado a importância destes na diminuição da produtividade do rebanho decorrentes de sua ação espoliativa bem como toda a problemática relativa à resistência anti-helmíntica.

Assim, neste trabalho foi isolada a albumina 2S de sementes de mamona, crambe e pinhão-manso, além de avaliar as suas atividades nematocidas e as alterações morfológicas promovidas em larvas de nematoides gastrintestinais de ovinos e em *Panagrellus* spp.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ovinocultura

Os ovinos foram uma das primeiras espécies de animais domesticados pelo homem, e sua criação possibilitava dispor de carne e leite como fontes de alimento e a pele como agasalhos. Atualmente, a criação de ovinos está presente em praticamente todos os continentes devido à ampla difusão da espécie determinada por seu poder de adaptação a diferentes condições climáticas e ambientais (VIANA, 2008).

Em 2017, o efetivo de ovinos no país foi de 17.976.367 milhões de cabeças (IBGE, 2017). Na região Nordeste do Brasil, a ovino-caprinocultura é uma importante atividade socioeconômica, com destaque para a agricultura familiar. Atualmente, a atividade se expande com investimentos de empresários e incentivos governamentais, dotando o criatório com soluções alternativas baseadas em tecnologias regionais (QUADROS, 2004, 2005).

A qualidade da carne das ovelhas é uma combinação dos atributos sabor, suculência, textura, maciez e aparência, associados a uma carcaça com pouca gordura, muito músculo e preços acessíveis (SOBRINHO et al., 2005).

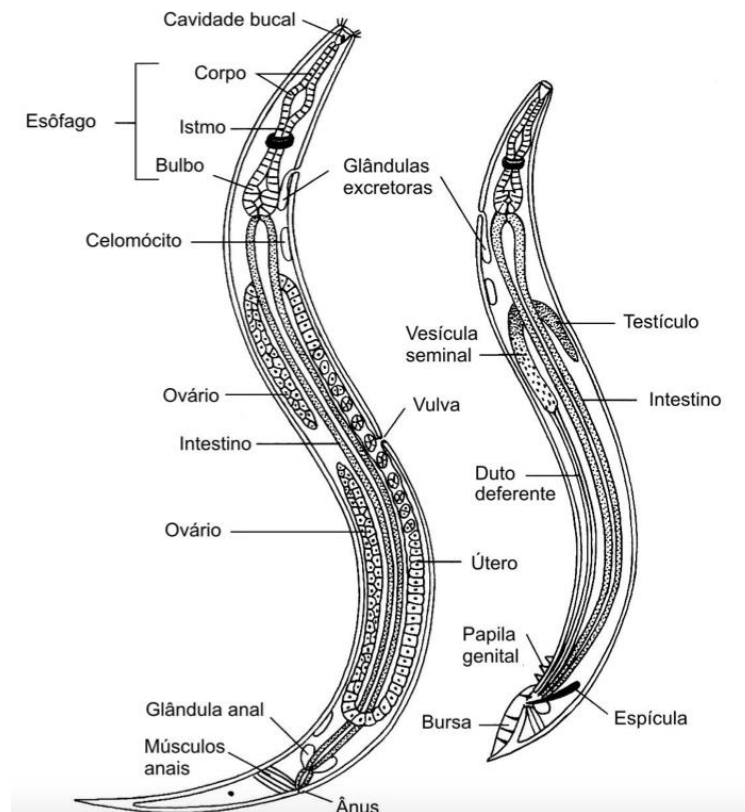
O mercado é bastante promissor e tem muito a ser conquistado, o que dependerá fundamentalmente da organização e gestão da cadeia produtiva, o que permearia o desenvolvimento e crescimento ordenado do setor (ARO; POLIZER; PENA, 2006). A diminuição do uso de fármacos anti-helmínticos e o uso de medidas alternativas de controle contribuem para obtenção da produção mais eficaz de carcaças de qualidade na ovinocultura (ROCHA, 2016).

2.2. Características gerais dos nematoides

Os nematoides são animais pseudocelomados, cosmopolitas, geralmente filiformes, alongados, não segmentados e com simetria bilateral, que apresentam organização funcional bem desenvolvida pela natureza (HICKMAN, 2013). Por serem organismos deuterostômios, o sistema digestivo é composto por boca e ânus, sistema nervoso bem desenvolvido, dioicos, sendo a fêmea dotada de ovários,

útero, vulva e ânus e os machos de algumas espécies dotadas com um par de espículas. Estruturas como dentes e dentículos estão presentes em diferentes grupos de nematoides e tem por função auxiliarem na fixação destes em órgãos, tecidos e alimentação (REY, 2011), conforme demonstrado na figura 1.

Figura 1. Estrutura geral do corpo do nematoide



Fonte: NEVES, D. P., 2016

A grande maioria compreende espécies de vida livre, ocupando extensamente todos os tipos de hábitat, desde o aquático ao terrestre e até mesmo em ambientes extremamente frios, assim, qualquer amostra de água ou de solo contém exemplares de helmintos (REY, 2011).

As muitas camadas de cutícula são majoritariamente constituídas de colágeno, uma proteína estrutural também abundante no tecido conjuntivo de vertebrados (AMARANTE, 2014). Uma das principais funções da cutícula é a proteção do organismo contra variações ambientais, além de atuarem na proteção para as delicadas estruturas internas. Três destas camadas compostas de fibras que se entrecruzam, o que confere elasticidade longitudinal para o verme, porém limita muito sua capacidade para expansão lateral (HICKMAN, 2013).

Durante as escdises, a cutícula participa efetivamente dos estádios de crescimento larvais do organismo e tem grande importância funcional para o nematoide, pois auxilia na estabilização a alta pressão hidrostática exercida pelo fluido pseudocelomático, protegendo assim, o organismo de ambientes hostis, como solos secos e os fluídos sintetizados pelo trato digestivo de seus hospedeiros (HICKMAN, 2013).

A evolução dos nematoides, de ovo a adulto, faz-se através de quatro estádios larvários que terminam por outras tantas mudas. As formas juvenis diferem das adultas, principalmente pelo tamanho e pela ausência das gônadas e órgãos copuladores (REY, 2011).

2.3. Nematoides de ruminantes

As verminoses dos caprinos e ovinos são causadas por parasitos pertencentes aos filos Nematoda e Platelmintos (classes Cestoda e Trematoda). Os nematoides podem se localizar em diversos locais no organismo hospedeiro, como no tubo digestivo (gastrintestinais), nos pulmões (pulmonares), na cavidade peritoneal, e até mesmo sob a forma de nódulos cutâneos, como em diversos casos de habronemose cutânea em equinos (QUADROS, 2004; SILVA et al., 2017).

As doenças de origem parasitária que atingem o trato gastrintestinal são consideradas de etiologia complexa e influenciadas por fatores diversos, tais como clima, práticas de manejo e idade dos animais. Sendo muitas delas de origem cosmopolita, podem atingir mais de 90% dos animais dos rebanhos. O fato destas parasitoses ocorrerem na grande maioria dos animais, que geralmente pode resultar na redução de produtividade e gerar grandes perdas econômicas (CHARLES, 1992).

Em condições naturais, a infecção por diferentes espécies de nematoides nos ruminantes, ocorre de forma concomitante (SANTOS et al., 2015). A prevalência destas helmintoses aumenta ou diminui na dependência de fatores climáticos ou susceptibilidade dos hospedeiros (OLIVEIRA et al., 2011). Na tabela 1 são apresentadas as diferentes espécies de nematoides que podem acometer ovinos bem como seus habitats e períodos pré-patente. Dentre todas as espécies observadas, as mais comuns no Brasil pertencem ao Gênero *Cooperia* e

Haemonchus, em bovinos, e *Haemonchus* e *Trichostrongylus* em ovinos e caprinos (CHARLES, 1992).

Tabela 1 - Espécies de nematoides gastrintestinais de ovinos, habitat, período pré-patente

Familia	Espécie	Hábitat	Período Pré Patente (dias)
<i>Haemonchidae</i>	<i>Haemonchus contortus</i>	Abomaso	18 – 21
	<i>Haemonchus similis</i>	Abomaso	18 - 21
Trichostrongylidae	<i>Trichostrongylus axei</i>	Abomaso	15 – 23
	<i>T. colubriformis</i>	Intestino delgado	15 – 23
	<i>Ostertagia ostertagi</i>	Abomaso	15 - 23
	<i>O. circumcincta</i>	Abomaso	15 – 23
	<i>O. trifurcata</i>	Abomaso	15 - 23
Cooperiidae	<i>Cooperia punctata</i>	Intestino delgado	17 - 22
	<i>Cooperia oncophora</i>	Intestino delgado	17 – 22
	<i>Cooperia pectinata</i>	Intestino delgado	17 - 22
	<i>Cooperia curticei</i>	Intestino delgado	17 – 22
	<i>Cooperia macmasteri</i>	Intestino delgado	17 - 22
Molineidae	<i>Nematodirus spatigher</i>	Intestino delgado	15 - 25
	<i>Nematodirus fillicolis</i>	Intestino delgado	15 - 25
Ancylostomatidae	<i>Bunostomum trigonocephalum</i>	Intestino delgado	53 – 60
Strongyloididae	<i>Strongyloides papillosus</i>	Intestino delgado	07 – 09

Cloacinidae	<i>Oesophagostomum columbianum</i>	Intestino grosso	40
	<i>O. venulosum</i>	Intestino grosso	28 - 31
Chabertidae	<i>Chabertia ovina</i>	Intestino grosso	63 - 70
Tricuridae	<i>Tricuris ovis</i>	Intestino grosso	42-84
	<i>Tricuris discolor</i>	Intestino grosso	42-84
	<i>Tricuris globulosa</i>	Intestino grosso	42-84

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6231>. Acesso em: 18/11/2019.

As espécies de nematoides participam de um importante grupo de parasitos em ruminantes (OTAKE *et al.*, 2014) sendo onipresentes podendo causar lesões graves em animais infectados e perdas significativas na produção (MOLENTO *et al.*, 2011). Nematoides hematófagos ao se alimentarem, retiram nutrientes de caprinos e ovinos, o que reflete em anemia e distúrbios gastrintestinais, retardando o crescimento, diminuição da produção (QUADROS, 2004).

Na infecção por nematoides, quantitativamente, a presença em número, não justifica obrigatoriamente a manifestação da doença, pois a mesma ocorre quando fatores favoráveis ao seu desenvolvimento e atingem níveis prejudiciais ao hospedeiro (COSTA, 2002).

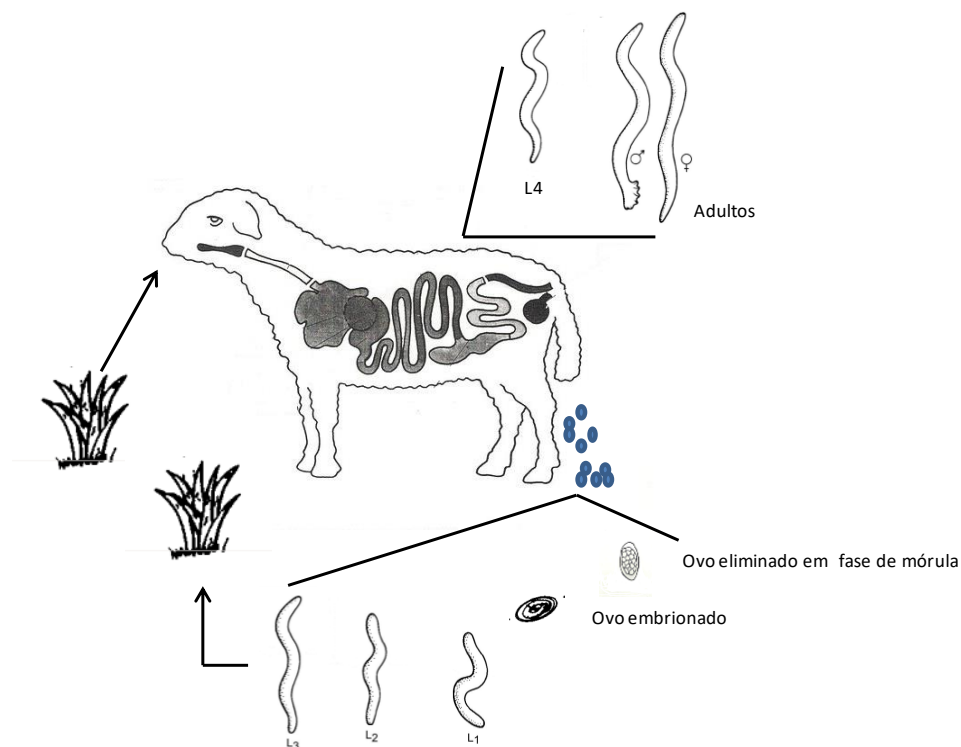
Os animais infectam-se ao ingerirem as larvas infectantes (L₃) presentes na pastagem. Os próprios animais são as fontes de contaminação do ambiente, pois eliminam nas fezes os ovos dos nematoides, os quais irão se desenvolver em três estádios, L₁, L₂ e finalmente L₃ (AMARANTE, 2014).

2.4. Ciclo de vida dos nematoides gastrintestinais em ovinos

O ciclo de vida dos parasitas de ovinos é do tipo direto, ou seja, envolve apenas um hospedeiro. Apesar de cada espécie apresentar peculiaridades em relação ao seu ciclo evolutivo, de forma geral, ele ocorre do seguinte modo: os parasitas adultos vivem no trato digestivo dos animais, onde realizam a postura de grande quantidade de ovos, que são eliminados em fase de mórula para o ambiente juntamente com as fezes (GOULART, 2008).

Desses ovos eclodem larvas de primeiro estágio (L_1) em cerca de 24 horas, que, após um período de desenvolvimento, mudam de cutícula e dão origem a larvas de segundo estágio (L_2), as quais, por sua vez, dão origem às larvas infectantes de terceiro estágio (L_3), isto é, aptas a parasitar um novo hospedeiro (AMARANTE, 2014) (Figura 2).

Figura 2- Ciclo de vida generalizado dos principais nematoides gastrintestinais de ovinos transmitidos ao hospedeiro via ingestão das larvas infectantes (L_3)



Fonte: Santos, C.P. (Fonte própria)

Larvas L_1 e L_2 se alimentam de microrganismos presentes no bolo fecal ao passo que a L_3 retém a cutícula do estágio anterior e não mais se alimenta. Em

condições adequadas de umidade e temperatura (20-30°C), a maioria das espécies completa essa fase de vida livre dentro de uma semana (CEZAR; CATTO; BIANCHIN, 2008).

Os ovinos, durante o pastejo, ingerem a vegetação contaminada pelas larvas no 3° estágio (L₃), que retomam o desenvolvimento no aparelho digestivo do ruminante, sofrendo muda originando uma larva de quarto estágio e dão origem a fêmeas e machos adultos, os quais após a cópula darão sequência ao ciclo evolutivo do parasita com a produção e eliminação de ovos pelas fêmeas (ARAÚJO, 2009). Portanto, existem duas fases distintas na vida do parasita, uma fase de vida livre e outra de vida parasitária (AMARANTE, 2014). No caso de espécies do gênero *Trichuris* spp., a larva infectante permanece no interior do ovo, e a eclosão só ocorre após a ingestão deste.

2.5. Resistencia anti-helmíntica

A resistência anti-helmíntica é um fenômeno pelo qual uma droga não consegue manter a mesma eficácia contra os parasitas, se utilizada nas mesmas condições, após um determinado período de tempo (CONDER; CAMPBELL, 1995). O primeiro relato é de 1964 com o composto thiabendazol, e nas décadas seguintes sucessivamente aparecem problemas com levamisol (1979), ivermectina (1988) e moxidectina (1995) (MOLENTO, 2005).

Dentre os compostos disponíveis, existem quatro grupos químicos distintos que são os mais utilizados: os benzimidazóis (ex: albendazole e oxibendazole), as pirimidinas e imidazotiazóis (ex: pamoato de pirantel e levamisole) e o grupo das lactonas macrocíclicas (ex: ivermectina e moxidectin). A grande diferença entre os grupos químicos está no seu mecanismo de ação diferenciado e nas formas de eliminação parasitária (MOLENTO, 2005).

O controle da nematodiose gastrintestinal dos ovinos, geralmente é realizado através do uso de anti-helmínticos. Porém devido ao custo elevado destes produtos, associado à falta de conhecimento básico no que tange a biologia e a epidemiologia dos parasitos, a maioria dos produtores não vermífuga adequadamente seus rebanhos. Conseqüentemente, os nematoides rapidamente desenvolvem resistência aos medicamentos utilizados (VIEIRA; XIMENES, 2001).

Os fatores que influenciam a seleção destas populações resistentes incluem além do uso indiscriminado e excessivo de anti-helmínticos, a frequente circulação de animais entre rebanhos e a inexistência de procedimentos de quarentena para os recém-chegados, fatores estes fortemente associados ao tipo de criação de pequenos ruminantes em sistema de pecuária familiar no semiárido brasileiro. (BORGES et al., 2015).

A falta de novas drogas no mercado fez com que se elevasse a busca por combinações de diferentes drogas. As combinações anti-helmínticas podem desempenhar um papel importante no gerenciamento da resistência, contudo os resultados de estudos apoiaram o conceito de que o uso de inseticidas em combinação pode prolongar significativamente a vida efetiva dos produtos químicos constituintes (BARTRAM et al., 2012). Porém, as informações sobre tais produtos não são de total clareza, sendo o efeito potencial aditivo ou ainda sinérgico destas combinações sobre cepas resistentes, ocorridos após a coadministração de duas drogas com modos de ações diferentes (NÄREAHO; VAINIO; OKSANEN, 2011).

2.6. Albuminas 2S

O termo albumina é dado a um grupo restrito de proteínas que são solúveis em água pura e que coagulam quando submetidas a altas temperaturas (OSBORNE, 1912). As albuminas 2S pertencem a uma família de proteínas de reserva integrantes da superfamília das prolamínas, que incluem inibidores de α -amilase e/ou tripsina, proteínas transportadoras de lipídeos não específicas, proteínas hidrofóbicas de soja e glicoproteínas de parede celular (BREITENEDER; MILLS, 2005; NASCIMENTO, 2009).

As Albuminas 2S apresentam uma massa molecular de 12-15 kDa, geralmente contendo oito ou mais resíduos de cisteína formando pontes dissulfeto. A maioria das Albuminas 2S são sintetizadas como proteínas precursoras longas que sofrem uma ou mais modificações pós-tradução (LEHMANN et al., 2006). São resistentes à desnaturação térmica e química, podendo, mesmo após os tratamentos de destoxificação desencadear alergia por contato ou por inalação (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2009).

Além da função reserva, outras funções fisiológicas como defesa podem ser atribuídas às albuminas 2S. Terras et al. (1992) observaram que uma albumina 2S extraída de sementes de *Raphanus sativus* inibia o crescimento do fungo fitopatogênico *Fusarium culmorum*. Em outro estudo, Terras et al. (1993) demonstraram que albuminas 2S extraídas de *Triticum* spp. (trigo) e de *Hordeum vulgare* (cevada) apresentaram atividade inibitória em colônias de bactérias gram-positivas, o que sugere mais um importante papel para as albuminas 2S, como moléculas de potencial atividade antimicrobiana.

Essa atividade inibitória se deve ao fato das albuminas 2S exercerem um efeito sobre a membrana, causando a perda dos componentes celulares (LEHMANN et al., 2006). Outras albuminas 2S, tais como as napinas de *Brassica napus* e "napin-like" albuminas purificadas de couve-flor (*Brassica oleracea* L.), mostarda dos campos (*Brassica hirta* Moenche) e mostarda preta (*Brassica nigra* Kock) são inibitórias de proteases serínicas, consistindo, também como proteínas de defesa contra fitopatógenos (GENOV et al., 1997).

2.7. Espécies oleaginosas

2.7.1. Mamona

A mamona (*Ricinus communis* L.) é uma planta conhecida como mamoneira, rícino, carrapateira, bafureira, baga e palmacriste no Brasil (Figura 3). (SANTOS et al., 2013). É uma planta de origem africana que pertence à família Euphorbiaceae que possui, aproximadamente, 406 gêneros e 8910 espécies, incluindo ervas, subarbustos, árvores ou lianas, que podem ser monoicas ou dioicas, perenes ou não (SOUZA, 2012).

Figura 3- Frutos e folhas da mamona



Disponível em: <http://g1.globo.com/sp/campinas-regiao/terra-da-gente/noticia/2016/07/mamona-e-usada-na-industria-quimica-e-na-producao-de-biodiesel>. Acesso em: 30/04/2019.

Embora seja encontrada em praticamente todo o território nacional, a mamoneira não é de origem brasileira. Apesar de sua grande dispersão, a origem da mamoneira não é bem determinada, sendo a antiga Abissínia, atual Etiópia, no continente africano, a região mais provável de sua origem. As grandes navegações escravagistas a teriam trazido para o Brasil, onde se adaptou muito bem ao clima (SEVERINO et al., 2006).

A cultura da mamona vem ganhando destaque na área agrícola brasileira em decorrência especialmente do óleo extraído da semente (Figura 4), proporcionando estímulos ao seu plantio e ao desenvolvimento tecnológico. Em resposta aos investimentos em pesquisa sobre esta planta, cresceu rapidamente o conhecimento sobre essa cultura nos últimos anos, em todas as áreas de estudo, desde a tecnologia de plantio até o aproveitamento de coprodutos (SEVERINO et al., 2006).

Figura 4- Sementes de mamona



Fonte: Fonte própria

A mamona é uma cultura difundida em praticamente todo o território brasileiro, o clima tropical facilitou o seu crescimento e desenvolvimento em grande parte do país, tendo já ocupado posição de destaque no agronegócio, com potencial para contribuir com o desenvolvimento agrícola sustentável do país (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2009).

A cultura de *Ricinus communis* L. representa uma grande opção para a agricultura familiar do semiárido do nordeste brasileiro, pois esta planta é bastante resistente à seca (BELTRÃO *et al.*, 2003). O principal produto obtido a partir da mamoneira é o óleo, o qual é um dos insumos para fabricação do biodiesel, tendo também outras utilidades como na alimentação, química têxtil, papéis, plásticos entre outros (AMARAL, 2003; BELTRÃO *et al.*, 2003; SOUZA, 2012).

A casca dos frutos e a torta são os dois principais coprodutos da mamona. A torta de mamona é produzida durante o processo de extração do óleo das sementes, sendo um resíduo de significativa importância econômica (SEVERINO *et al.*, 2006). O resíduo sólido proveniente da prensagem das sementes possui alto teor de proteínas e é produzido na proporção de 1,2 t por tonelada de óleo extraído. Este coproduto da cadeia produtiva da mamona pode ser utilizado como adubo orgânico nas culturas de café, *Citrus*, cana-de-açúcar, hortaliças, frutífera e conhecida como produto que apresenta efeito nematicida (FILHO, *et al.*, 1977).

A torta de mamona é rica em micronutrientes, como nitrogênio, fósforo e potássio, atributos que a qualifica como um insumo adequado como adubo. É rica em proteínas, despertando interesse para complemento em ração animal, o que agregaria valor comercial (SOUZA, 2012). No entanto, estas aplicações não tem sido possível, até o presente momento, devido à presença de elementos tóxicos e alergênicos em sua composição e à inexistência de tecnologia viável em nível industrial para seu processamento (SEVERINO, 2005; BELTRÃO; OLIVEIRA, 2009). Por outro lado, a torta de mamona apresenta ação herbicida, inseticida e nematicida (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2009). O emprego potencial no controle de pragas e doenças decorre das inúmeras substâncias constitutivas da torta. Algumas delas, são tóxicas como aglutinina, ricina e ricinina e outras alérgicas como albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3 (MACHADO *et al.*, 1992) e que naturalmente são metabolizadas na defesa da planta.

2.7.2. Pinhão-manso

Pertencente à família Euphorbiaceae, a mesma da mamona, o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) (Figura 5) é originário, provavelmente, do México e América Central e nos dias de hoje encontra-se cultivada na Índia e em vários países da África, Ásia e Américas do Sul e Central (MARQUES; FERRARI, 2008). O pinhão manso é conhecido também como pinhão do Paraguai, purgueira, pinhade-purga, grão-de-maluco, pinhão-de-cerca, turba, tartago, medicineira, tapete, siclité, pinhão-do-inferno, pinhão bravo, pião e pinhão-das-barbadas (ARRUDA et al., 2004).

Figura 5- Frutos de pinhão-manso



Disponível em: <http://ruralpecuaria.com.br/noticia/embrapa-agroenergia-entra-na-segunda-fase-das-pesquisas-com-pinhao-manso-geradas-por-cruzamento.html>. Acesso em: 30/04/2019.

O pinhão-manso é uma planta perene, resistente à seca e bem adaptada às regiões áridas e semiáridas, onde é usada para o controle da erosão e como cercas vivas. As primeiras aplicações comerciais dessa planta foram reportadas em Lisboa onde o óleo importado de Cabo Verde era utilizado para fabricação de sabão e produção de lâmpadas (SUBRAMANYAM et al., 2010).

Este vegetal tem o diâmetro do tronco de, aproximadamente, 20 cm com poucas ramificações (ARRUDA et al., 2004). As flores são pequenas, amarelo-esverdeadas e o fruto é uma cápsula com três sementes escuras e lisas (MARTINS et al., 2008). Cresce na forma de arbusto perene ou árvore pequena. Estabelece-se bem em condições climáticas desfavoráveis, é resistente à seca por sua baixa demanda de umidade, baixa necessidade de fertilidade e tolerância às altas temperaturas (SUBRAMANYAM et al., 2010), é conhecida por suas sementes

possuírem óleo com potencial para emprego na produção de biocombustível (LOPES, 2013).

No Brasil o pinhão-manso é uma das oleaginosas potenciais para o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel, podendo apresentar alta produção de grãos e óleo vegetal por área plantada. Essa espécie é cultivada em várias regiões brasileiras, principalmente, no Sudeste, Centro-oeste e Nordeste com mais de 30 mil hectares e potencial de produção de 90 mil toneladas de grãos por ano (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009).

As sementes dessa planta (Figura 6) são fontes de óleo utilizado para substituir o diesel, na indústria de cosméticos e com fins medicinais (MARTÍNEZ-HERRERA et al., 2006). As sementes contêm purgante, óleos, taninos, terpenos, ésteres de forbol, curcina e uma toxalbumina como principais constituintes que são considerados os prováveis constituintes tóxicos (ABDEL GADIR *et al.*, 2003; RAKSHIT et al., 2008), sendo conhecida há décadas a toxicidade existente na semente, atribuída esta, principalmente à presença de dois componentes nas sementes: uma proteína inativadora de ribossomos, curcina e a ésteres diterpenos. A curcina é similar à ricina, uma proteína tóxica isolada de sementes de mamona (*Ricinus communis L.*), que apresenta duas cadeias polipeptídicas, uma com função de lectina e outra capaz de inibir a síntese proteica (HOLTZ et al., 2015). A presença de albuminas 2S em pinhão manso foi descrita por Maciel et al. (2009).

Figura 6- Sementes de pinhão-manso



Fonte: Arquivo pessoal

2.7.3. Crambe

Crambe abyssinica Hochst, popularmente conhecido como crambe (Figura 7), é uma oleaginosa da família Brassicacea, originada no mediterrâneo, cultivada na América do Sul, Ásia, África, Estado Unidos e Europa (HARDMAN et al., 1989). Seu cultivo no Brasil foi iniciado em 1995, na estação de pesquisa da Fundação MS, em Maracajú – MS, sendo logo identificada como uma cultura promissora para a produção de biodiesel. Seu cultivo é mecanizado e é semeado como cultura de inverno entre março a maio, podendo se estender a junho (VIANA, 2013).

Figura 7- Inflorescência do Crambe



Disponível em: <https://rotaenergia.wordpress.com/2012/03/28/crambe-nova-alternativa-para-os-biocombustiveis/>. Acesso em: 30/04/2019

A árvore pode chegar a 1-2 m de altura, ramifica-se próxima ao solo formando galhos terciários. Suas folhas são ovais e assimétricas (HARDMAN et al., 1989). As flores são brancas ou amarelas que produzem inúmeras sementes que são mantidas em pequenas cápsulas e cada cápsula contém apenas uma semente esférica marrom esverdeada com 0,8-2,6 mm de diâmetro. As cápsulas geralmente permanecem em torno das sementes após a colheita, o casco tem volume de 25 a 30% (FALASCA et al., 2010).

As sementes de crambe (Figura 8) contêm em torno de 38% de óleo que é rico em ácido erúico (50- 60%), que é uma matéria-prima industrial útil e por isso, foi considerado um substituto ao óleo de colza (*Brassica napus*) a principal fonte de ácido erúico até agora. O óleo tem um bom potencial como produtor técnico para uso industrial que pode ser utilizado como lubrificante industrial, inibidor de corrosão,

filmes plásticos, náilon, adesivos, isolantes elétricos e como ingrediente na fabricação de borracha sintética (LEPPIK; WHITE, 1975; FALASCA et al., 2010; OLIVA, 2010; LARA-FIOREZE et al., 2013). A partir do óleo, é obtida a erucamida, uma amida orgânica, derivado do ácido erúcico, que pode ser usada em usos como fabricação de plásticos, borrachas, cosméticos, detergentes, produção de biodiesel, dentre outras (MULDER; MASTEBROEK, 1996; CARLSSON, 2009; SANTOS et al., 2014). Além do farelo, que pode ser utilizado como suplemento protéico na nutrição animal em porcentagem relativamente baixa (JASPER et al., 2010).

Figura 8- Sementes de crambe



Fonte: Arquivo pessoal

A extração de óleo de semente de crambe gera um coproduto que foi testado pelos efeitos potenciais nematicidas e fitotóxicos no controle de nematoides. Este coproduto contém glucosinolatos, que degradam e liberam isotiocianatos e epiprogoitrina, que apresentam ação supressora nos fitonematóides do gênero *Meloidogyne* (WALKER, 1996).

O crambe é considerado um produtor de óleo não alimentar, pois além do ácido erúcico, o óleo de crambe também contém ácido oleico (16%), linoleico (9%), esteárico (5%) e pequenas quantidades de palmítico (3%). Pesquisa e desenvolvimento adicionais para melhorar o crambe como produtor de óleo não alimentar inclui aumento da produção de sementes, resistência ao inverno, protocolo de transformação e engenharia metabólica para produção de óleos técnicos (CARLSSON, 2009).

A composição química das sementes de crambe foi parcialmente caracterizada por Massoura et al. (1998), o qual demonstrou que as duas frações proteicas derivadas da oleaginosa crambe compreendem proteínas com

características de distribuições de peso molecular que mostram propriedades funcionais diferentes e interessantes em possíveis aplicações alimentares ou não, como espuma de concreto e material de embalagem espumado.

Recentemente, Araújo (2019) confirmou através das metodologias aplicadas a extração, purificação e identificação por espectrometria de massas, degradação de Edman e dicroísmo circular que as proteínas da classe albuminas 2S estão presentes em sementes de crambe.

2.8. Nematóide de vida livre (*Panagrellus* spp.)

Os nematoides de vida livre do gênero *Panagrellus* são utilizados como modelo experimental em pesquisas envolvendo compostos com atividade nematicida, devido à facilidade de seu cultivo, ciclo de vida curto e por sua alta motilidade na água, o que permite efeitos tóxicos menores observados mais facilmente em nematoides desse gênero (GOMESA et al., 2019).

Atualmente, o gênero *Panagrellus* compreende 12 espécies conhecidas, com descrições em quase todos os continentes, exceto na Antártica e Austrália. Esses nematoides têm distribuição mundial e foram encontrados em uma variedade de habitats, como fluxo de lodo, fontes termais e insetos. O diagnóstico de espécies de *Panagrellus* é problemático, uma vez que poucas características morfológicas podem ser usadas para discriminar as espécies, publicações originais não indicam o número de espécimes e não têm descrições padrão de variação (STOCK; NADLER, 2006).

A primeira espécie de *Panagrellus* reconhecida foi o nematóide atualmente conhecido como *Panagrellus redivivus*, descrito originalmente por Linnaeus (1767). As espécies foram descritas baseadas em características morfológicas ou dados morfométricos. Somente a morfologia do espículo e ocasionalmente a estrutura da vulva nas fêmeas é útil para diagnóstico e identificação de espécies (AFFANDI et al., 2019).

Pouco se sabe sobre a bionomia do *Panagrellus* spp. e suas interações com outros microrganismos. De acordo com seus hábitos alimentares, esses nematoides,

como bem como outros membros do Panagrolaimidae são considerados seres microbívoros de vida livre (AFFANDI et al., 2019).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade nematicida das albuminas 2S provenientes de sementes de mamona, pinhão-manso e crambe sobre *Panagrellus* spp. e nematoides gastrintestinais de ovinos.

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar se existe diferença entre as atividades nematicidas das albuminas 2S de oleaginosas de mamona, pinhão-manso e crambe sobre *Panagrellus* spp. e nematoides gastrintestinais de ovinos.
- Determinar a dosagem ideal para ação contra as larvas de *Panagrellus* spp. e nematoides gastrintestinais de ovinos.
- Avaliar o efeito de albumina 2S na ultraestrutura de larvas dos nematoides gastrintestinais de ovinos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção das sementes

As sementes de mamona e pinhão-manso foram fornecidas pela “Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (Embrapa)” – Campinas, São Paulo e as sementes de crambe fornecidas pela Fundação MS para a Pesquisa e Difusão de Tecnologias Agropecuárias, Maracaju, Mato Grosso do Sul.

4.2. Extração de Proteínas

4.2.1. Mamona

As frações da semente da mamona foram extraídas de acordo com a metodologia descrita por Thorpe et. al. (1988) com adaptações feitas por Machado et al. (1992). As sementes (200 gramas) de mamona foram descascadas e maceradas. A massa resultante foi embebida em 300 mL de hexano na proporção 1:2 e mantida sob agitação por duas horas. O material foi centrifugado por 30 minutos a 3.500 x g em temperatura de 4° C e a gordura descartada. A essa massa foi adicionado tampão fosfato 0,2 M pH 7,0 na proporção 1:5 sob agitação por 3h (a temperatura ambiente). O homogenato foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos (a 8°C). O material foi filtrado para retirar todo sedimento e lipídeos, que foram descartados posteriormente. Ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio até 90% de saturação e em seguida o material foi armazenado a 4°C. A suspensão foi centrifugada a 15.000 x g por 15 min e o sobrenadante descartado. O precipitado resultante foi dissolvido em H₂O (1mL para cada 1g de semente macerada). O material foi fervido em banho maria visando flocular a ricina, por 5 minutos. Em seguida foi realizada uma nova centrifugação (3000 x g por 15 minutos), na qual o sobrenadante foi recolhido e armazenado na geladeira.

4.2.2. Pinhão-manso

Foi realizada de acordo com o processo de extração de proteínas proposto por Maciel et al. (2009). As sementes (650 gramas) foram trituradas e as proteínas

foram então extraídas com tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0, na proporção 1:4 (1g/4mL). Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos a 4° C, o sedimento foi descartado e o sobrenadante obtido novamente centrifugado nas mesmas condições anterior. Posteriormente, o sedimento descartado e o sobrenadante contendo o extrato proteico foram armazenados a -20 °C.

4.2.3. Crambe

A extração é baseada na solubilidade das albuminas 2S em tampão fosfato 0,2 M pH 7,0. Foi realizada de acordo com o processo de extração de proteínas proposto por Machado et al. (1992). As sementes (200 gramas) foram trituradas em processador e as proteínas foram então extraídas com tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,0, na proporção 1:4 (1g/4mL) durante 3 h sob agitação em temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 10.000 g por 15 min a 4° C, o sedimento foi descartado e o sobrenadante obtido foi novamente centrifugado nas mesmas condições anterior. O sedimento foi descartado e o sobrenadante contendo o extrato rico em albuminas 2S de crambe foi armazenado a -20°.

4.3. Fracionamento de Proteínas

4.3.1. Cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-50)

Os diversos extratos brutos ricos em proteínas obtidos na etapa anterior foram fracionados por exclusão molecular em coluna Sephadex G-50, utilizando TFA 0,1% no extrato de mamona, TRIS 0,01% no extrato de pinhão-manso e PBS 0,01% no extrato de crambe como fase móvel, sob um fluxo constante de 1mL/min. O volume coletado foi de 1mL por tubo e a detecção de proteínas foi realizada por leituras de absorvância a 220/280nm (MACHADO et al., 1992). A fração de interesse foi concentrada por liofilização e armazenada a -20 °C para ser utilizada nas etapas posteriormente.

4.3.2. Cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-25)

A fração rica em albuminas 2S isolada de sementes de crambe pelo fracionamento anterior foi dessalinizada por cromatografia de filtração em Sephadex G-25, utilizando água destilada como eluente, conforme descrição no item anterior.

4.3.3. Cromatografia de fase reversa em coluna C18

Cada fração indicativa contendo o “pool” de albuminas 2S obtido das sementes de mamona, pinhão-manso e crambe na cromatografia de exclusão molecular foi submetida à cromatografia de fase reversa em coluna C18, sob um fluxo constante de 0,7 mL/min em sistema de alta performance HPLC (High Performance Liquid Chromatography) da Shimadzu®, modelo LC-10AD (estação de trabalho “Class-LC10”). Para eluição foi empregado um gradiente de hidrofobicidade formado por ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em água (solução A) e Acetonitrila 80% contendo TFA 0,1% (solução B). O perfil de eluição foi monitorado por medição da absorvância a 220 nm. Os espectros de UV (ultravioleta) foram obtidos utilizando um detector fotodiodo e as frações de interesse foram coletadas, secas em concentradores centrífugos tipo *Speed-Vac*.

4.4. Quantificação e caracterização das proteínas isoladas

4.4.1. Dosagem de proteínas

A determinação da concentração de proteínas das amostras em estudo foi realizada pelo método de BCA - Ácido Bicinconínico (SMITH, et al, 1985), sendo utilizada a BSA (albumina sérica bovina) como padrão. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro modelo UV-VIS a 595 nm.

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

As frações obtidas através da cromatografia líquida de exclusão molecular foram submetidas à análise de homogeneidade por eletroforese em gel de

poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15% com 1 mm de espessura (LAEMMLI, 1970). 30 μ L de cada fração obtida das sementes foram aplicados por poço. Com o término da corrida, o gel foi corado com o corante Coomassie Brilliant Blue, permanecendo na solução por 30 minutos ou até que as bandas aparecessem. O gel foi descorado com uma solução descorante (metanol 40% / ácido acético glacial 10% / água 50%).

4.4.3. Western Blotting

Para avaliação da presença de albumina 2S presente nas frações obtidas das sementes a partir das extrações, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDSPAGE) a 15% seguida de imunodeteção (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). O gel foi transferido para a membrana de nitrocelulose utilizando o papel filtro embebido previamente em tampão de transferência (20 mM de Tris, 145 mM de glicina e metanol 20%) e formado um sistema “sanduíche”. A transferência foi realizada com uma corrente de 1 mA/cm² da membrana por um período de 2 horas. Finalizada a transferência, a membrana foi retirada do sistema “sanduíche” e corada com corante Ponceau. Após a visualização das bandas proteicas, a membrana foi lavada com água ultrapura (milli-Q) e embebida no tampão bloqueador (PBS - tampão fosfato salino pH 7,6 e 2% de leite em pó desnatado) por 2 horas sob agitação. Em seguida a membrana foi lavada com PBS por 5 vezes, trocando o tampão a cada 1 minuto. Após isso, a membrana foi incubada com o anticorpo primário policlonal anti-albumina 2S de mamona produzido em coelho (diluído 1:500 em tampão bloqueador) por 18 horas a temperatura de 4°C. Posteriormente a membrana de nitrocelulose foi lavada com tampão PBS por 5 vezes, trocando o tampão a cada 1 minuto, e a seguir incubada por 2 horas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase diluído 1:1000 no tampão bloqueador. A revelação foi feita utilizando solução contendo DAB (Diaminobenzidina 99% - Aldrich®), 2 M de Tris/HCl pH 7,5, 0,1 M de Imidazol, peróxido de hidrogênio 30% e água ultrapura. A reação ocorreu sob o abrigo de luz por 15 minutos.

4.5. Ensaio Biológico

4.5.1. Obtenção das larvas (L₃) de nematoides gastrintestinais

Foram utilizados ovinos da raça Santa Inês, criados na unidade experimental (curral) da UENF como doadores de fezes positivas para nematoides gastrintestinais. As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de ovinos e armazenadas sob refrigeração até análise em laboratório. Após a coleta o material foi homogeneizado, pesado e realizado a contagem dos ovos por grama de fezes (OPG) para confirmar a infecção. As larvas de 3º estágio (L₃) foram obtidas através da técnica de Robert e O'Sullivan (1950) para coprocultura com as seguintes modificações: após homogeneização das fezes, foram pesados 4 g em copos descartáveis de 50 mL e em seguida armazenadas em caixas plásticas contendo 100 mL de água destilada. As caixas foram vedadas com um plástico filme e incubadas por sete dias em temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado água destilada ao copo descartável e em seguida tampou-se com uma placa de Petri. Estes foram invertidos e acrescentado 10 mL de água destilada no bordo livre da placa de Petri. Após 4h as L₃ presentes na água destilada foram coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur, transferidas para garrafas de cultura de 30 mL e armazenadas em geladeira (4°C).

4.5.2. Cultivo e manutenção de nematoides de vida livre

Os nematoides de vida livre *Panagrellus* spp. (modelo de estudo *in vitro*), foram mantidos em meio de cultura ágar/aveia com intervalos de cerca 15 – 21 dias foram realizadas trocas do meio de cultura em função da exaustão deste. Para o ensaio biológico os nematoides foram retirados do meio e lavados em água destilada.

4.6. Ensaio de atividade biológica

4.6.1. Atividade biológica de albumina 2S contra nematoides gastrointestinais

Foram utilizadas as concentrações de 0,6; 1,2; 2,4 e 11 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para albumina 2S de mamona; 0,09; 0,27; 0,55; 0,92; 1,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para albumina 2S de pinhão-manso; 0,06; 0,13; 0,2; 0,41 e 0,69 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para albumina 2S de crambe com PBS, 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para albumina 2S de crambe e 6 e 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ do PBS. Os testes foram feitos em triplicata em placas de 24 poços contendo \pm 100 L3/poço. Um grupo controle negativo contendo água destilada e nematoides foi também realizado. As placas foram incubadas a 25 °C por até 48 horas e o número de L₃ mortas foram contabilizados com auxílio de um microscópio invertido.

4.6.2. Ensaio com albumina 2S de mamona em *Panagrellus* spp.

Os nematoides foram avaliados frente às concentrações de 0,04; 0,4 e 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ da albumina 2S de mamona. Os testes foram feitos em triplicata em placas de 24 poços contendo \pm 100 nematoides/poço. Um grupo controle negativo contendo água destilada e nematoides foi também realizado. As placas foram incubadas a 25 °C por até 48 horas quando então foram quantificados o número de nematoides mortos com auxílio de um microscópio invertido.

4.7. Avaliação das alterações ultraestruturais

Para as análises das alterações morfológicas promovidas pelas albuminas 2S, as larvas tratadas foram fixadas em Paraformaldeído (PA) 4%, Glutaraldeído (GA) 2,5% e Tampão CaCodilato de Sódio (TCaCO) 0,1M, por 24h. Após este período todas as amostras foram lavadas três vezes em mesmo tampão no tempo de 30 minutos, pós-fixadas em Ósmio 1% por 1h e lavadas novamente em TCaCO conforme descrito acima. As amostras foram então processadas para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) conforme descrito a seguir: L₃ foram desidratados em series crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) sendo a troca a cada 1h, no entanto para o último foram feitos três trocas a cada 30 minutos, em seguida as amostras foram incluídas em resina do tipo SPURR em proporções de 5:1

acetona/spurr: spurr/acetona e sua troca feita a cada 24h. Ao final as amostras em resina pura foram levadas em estufa 60°C por 48h. Os blocos foram levados ao ultramicrotômo e cortes de 70 nm foram obtidos. Os cortes foram colocados em grades de cobre de 400 mesh contrastados em acetato de uranila 1% e citrato de chumbo 5%, lavados em água destilada e visualizados em microscópio eletrônico de transmissão JEM-1400Plus (JEOL Ltda, Tóquio, Japão) a 80 kV.

4.8. Análise estatística

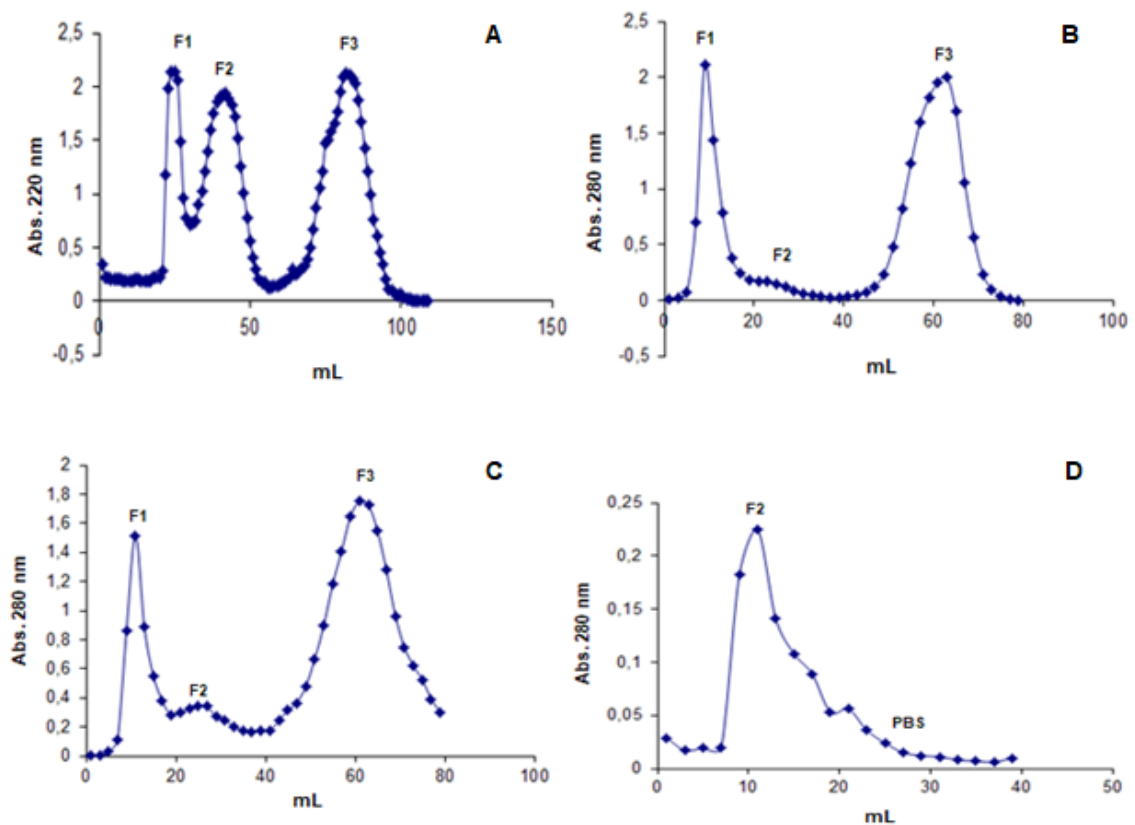
Os resultados dos tratamentos com as albuminas 2S e seus efeitos nematocidas foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e o teste Tukey foi feito para comparar as médias, sendo considerado o nível de significância quando $P < 0,05$. As análises e gráficos gerados foram obtidos com o auxílio do programa GraphPad Prism 4.0.

5. RESULTADOS

5.1. Perfil cromatográfico (Filtração em gel)

Foram obtidas três frações proteicas de acordo com o perfil cromatográfico (Sephadex G-50) relativo ao fracionamento do extrato bruto de proteínas da semente de mamona, crambe e pinhão-manso: F1, fração de massa molecular (MM) > 35 kDa ; F2, fração 35 <MM> 12-17 kDa, regiões previstas com os perfis cromatográficos das albuminas 2S; e F3, fração de massa molecular <10 kDa, conforme demonstrado na figura 9. Em D verificamos o perfil cromatográfico obtido durante a dessalinização da proteína de crambe utilizando Sephadex G-25.

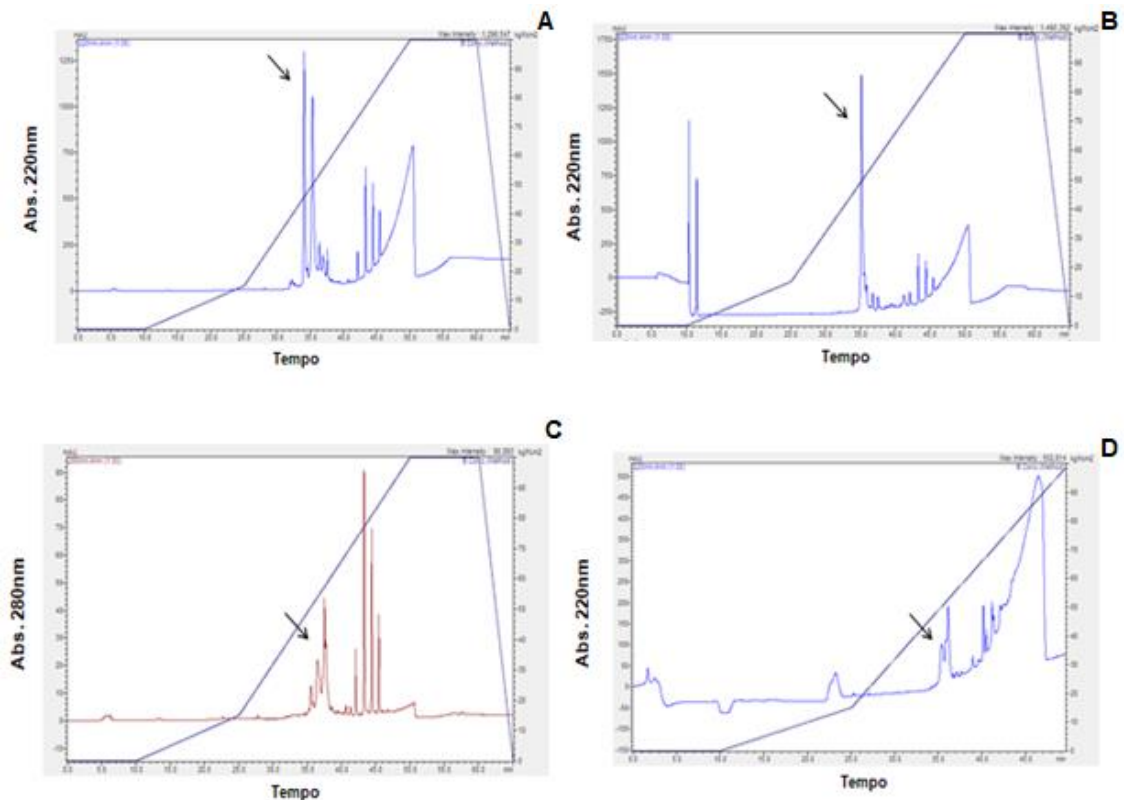
Figura 9 - Perfil cromatográfico da filtração em gel (Sephadex G-50) do extrato bruto das sementes de mamona (A), pinhão-manso (B) e crambe (C). Em "D" o perfil cromatográfico do crambe em gel Sephadex G- 25. Eluição de TFA 0,1% (A), TRIS 0,01% (B), PBS 10 X (C) e água (D). Fluxo 1 mL/min e coletadas frações de 1mL



5.2. Perfil cromatográfico (Fase reversa HPLC)

Os perfis cromatográficos referentes ao fracionamento da albumina 2S em sistema de alta eficiência (coluna C18), como descrito na metodologia no item 4.3.3. de mamona, crambe e pinhão-mansó foram esquematicamente representados na figura 10 abaixo. A seta indica o tempo de retenção das albuminas 2S.

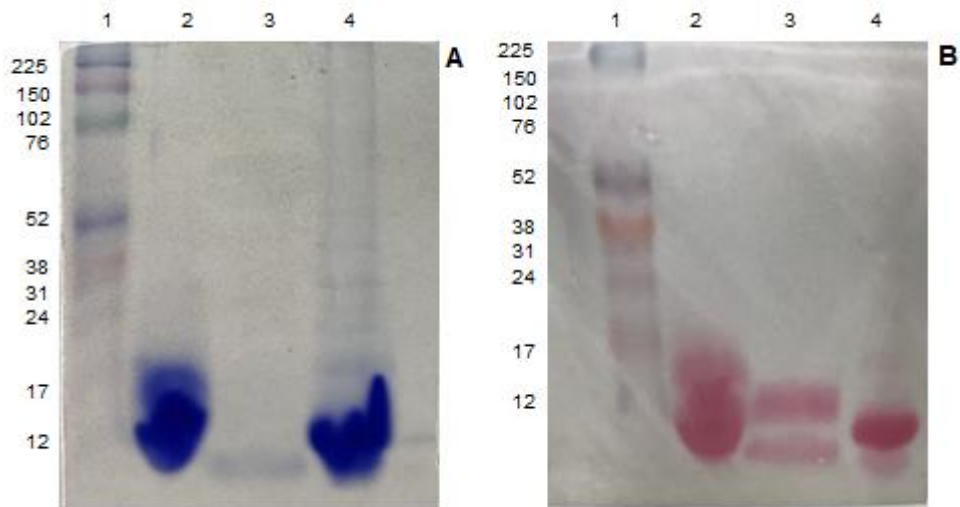
Figura 10 - Perfil cromatográfico de albumina 2S de sementes de mamona (A), pinhão-mansó (B) e crambe (C) após cromatografia em coluna de fase reversa C18, sistema HPLC. Em "D" o perfil cromatográfico referente ao fracionamento da albumina 2S de crambe após cromatografia em Sephadex G-25. Um gradiente de hidrofobicidade formado por ACN // 0,1% de TFA foi usado para eluição



5.3. Homogeneidade das frações (SDS-PAGE)

A análise eletroforética das frações oriundas da cromatografia de fase reversa (HPLC) permitiu observar o perfil proteico das frações G-50 de mamona, crambe e pinhão-mansó tendo estas massas moleculares próximas de 12 e 17 kDa conforme demonstrado na figura 11.

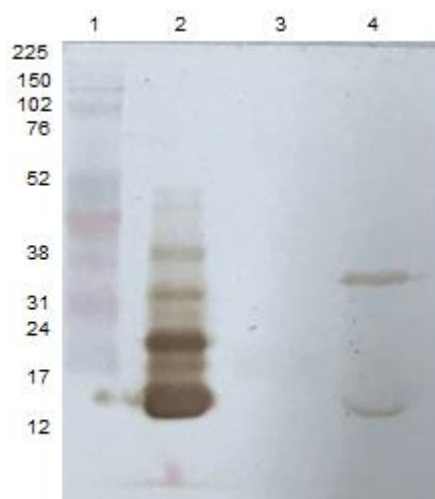
Figura 11- Perfil proteico das frações G-50 (A) e mesmo perfil após transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose e coradas com Ponceau (B). Marcador de peso molecular (1); fração de albumina 2S de mamona (2), de crambe (3) e pinhão-mansó (4)



5.4. Imunodetecc3o das albuminas 2S (Western blotting)

A presença das albuminas 2S nas fra3es foram confirmadas atrav3s do ensaio Western Blotting utilizando anticorpo prim3rio produzido em camundongo anti-albumina 2S de crambe. Duas bandas fortes para mamona entre 12 e 17 kDa e outra entre 17 e 24 kDa. Para crambe n3o visualizamos marca3o e para a amostra do pinh3o-mansó, duas bandas fracas foram visualizadas entre 12 e 17 kDa e outra entre 31 e 38 kDa (Figura 12).

Figura 12- Perfil proteico por Western Blotting das fra3es albumina 2S de mamona, crambe e pinh3o-mansó. Marcador de peso molecular (1), fra3o de albumina 2S de mamona (2), crambe (3) e pinh3o-mansó (4)

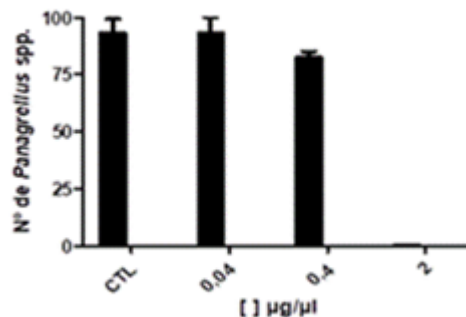


5.5. Atividade nematicida de albumina 2S sobre nematoides

5.5.1. Albumina 2S de mamona

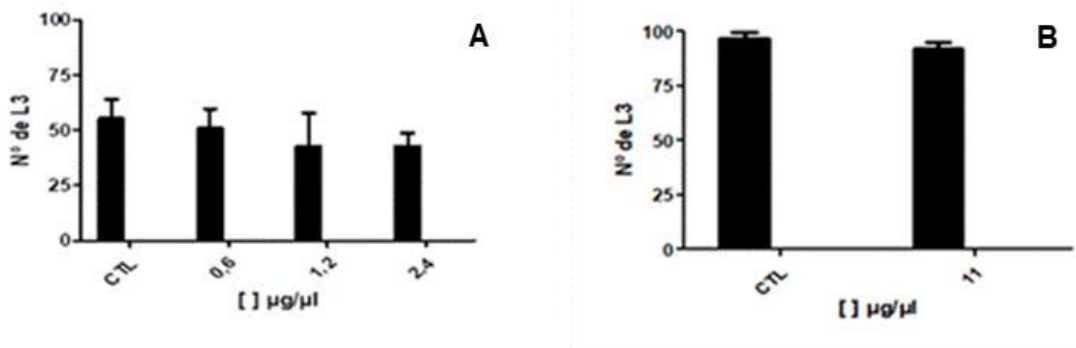
Ensaio de atividade nematicida sobre o nematoide de vida livre *Panagrellus* spp. foram realizados com albumina 2S de mamona. A figura 13 apresenta os dados obtidos. Os resultados demonstraram que ocorreu uma diminuição efetiva na taxa de sobrevivência de *Panagrellus* spp. quando estes foram expostos as concentrações de 0,4 e 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de albumina 2S de mamona *Ricinus communis* L. por 48 horas de incubação na temperatura de 25°C (Figura 13).

Figura 13- Número de *Panagrellus* spp. sobreviventes no controle negativo e com diferentes concentrações 0,04; 0,4 e 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Albumina 2S de mamona após 48 horas de cultivo a 25° C



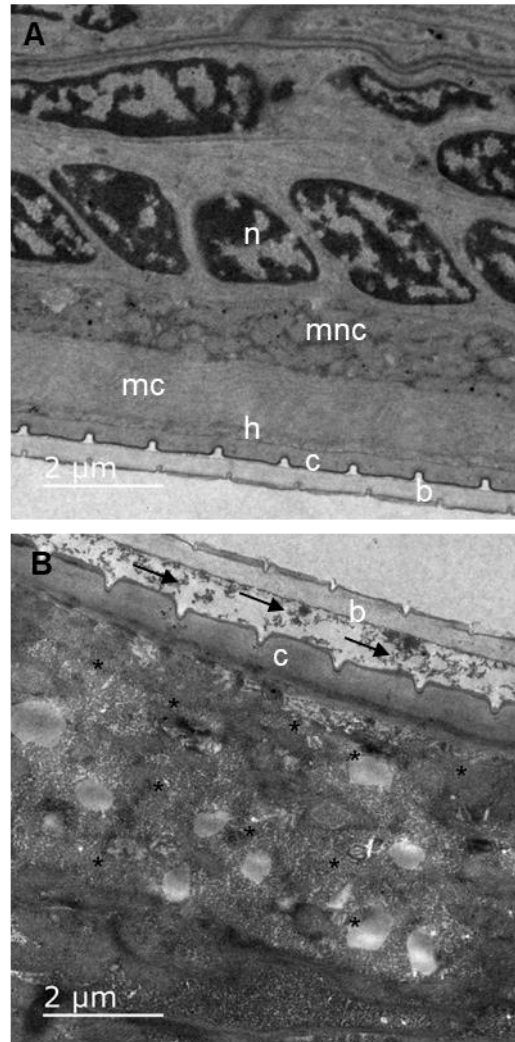
Na figura 14 (A e B) são apresentados os resultados para o efeito dos tratamentos com albumina 2S de mamona realizados com as larvas (L_3) de nematoides de ovinos sob as concentrações 0,6; 1,2; 2,4 e 11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ da albumina 2S de mamona *Ricinus communis* L.

Figura 14- Número de larvas (L_3) sobreviventes no controle negativo e com diferentes concentrações 0,6; 1,2; 2,4 (A) e 11 (B) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de albumina 2S de mamona após 48 horas de cultivo a 25°C



Apesar de não observarmos uma atividade nematicida significativa de albumina 2S de mamona frente a nematoides de ovinos nas larvas (L_3), os mesmos foram avaliados quanto sua morfologia. A ultraestrutura das larvas (L_3) de nematoides gastrintestinais de ovinos, tratados com albumina 2S de mamona nas concentrações 1,2; 2,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Foi realizada e observou-se claramente estruturas preservadas no controle (Figura 15 A) e uma desorganização ultraestrutural da camada muscular e um infiltrado particulado preenchendo o espaçamento entre bainha e cutícula (Figura 15 B).

Figura 15- Ultraestrutura por M.E.T. das larvas (L₃) de nematoides gastrintestinais de ovinos não tratada (A) e tratada com albumina 2S de mamona. As larvas foram Incubadas por 48h em B.O.D 25°C. Bainha (b); cutícula (c); hipoderme (h); musculatura não contrátil (mnc); musculatura contrátil (mc); núcleo (n); setas indicam infiltrado particulado entre a bainha e cutícula e asteriscos desorganização ultraestrutural.

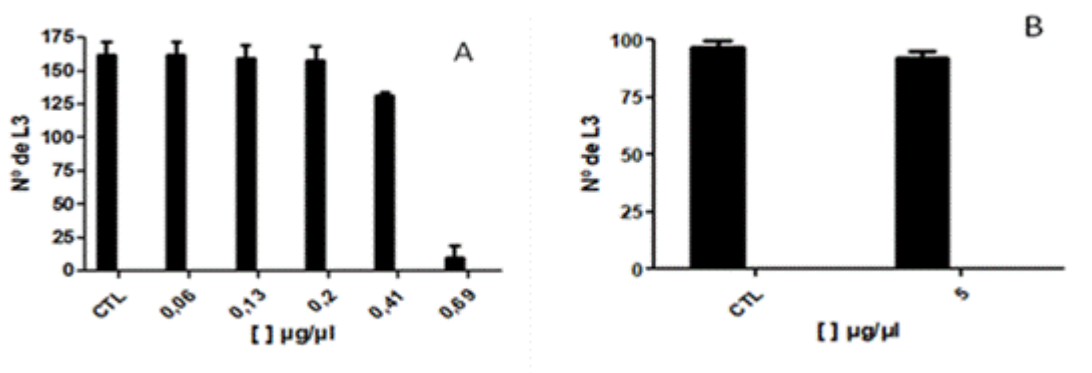


5.5.2. Albumina 2S de crambe

A fração de albumina 2S extraída de cambre (*Crambe abyssinica Hochst*) obtida de cromatografia em Sephadex G-50 submetida à liofilização com PBS 0,01% apresentou atividade nematicida sobre os nematoides gastrintestinais de ovinos satisfatória nas concentrações de 0,41 e 0,69 µg/ µl (Figura 16 A), enquanto a amostra com Sephadex G-25, a ausência de PBS 0,01% não interferiu na sobrevivência das larvas (L₃). Nestas concentrações o número médio de L₃

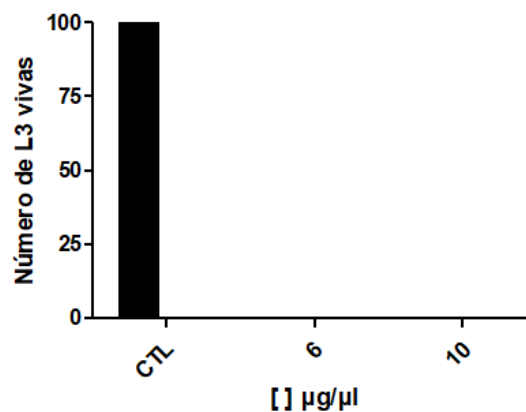
sobreviventes foram respectivamente de 134 ± 1 e 10 ± 8 ao passo que no controle negativo foi de 162 ± 9 ($P < 0,05$) (Figura 16 B).

Figura 16- Número de larvas (L_3) sobreviventes no controle e com diferentes concentrações de Albumina 2S de crambe após 48 horas de cultivo a 25°C . (A) Albumina 2S oriunda de liofilização com PBS. (B) Albumina 2S liofilizada sem PBS



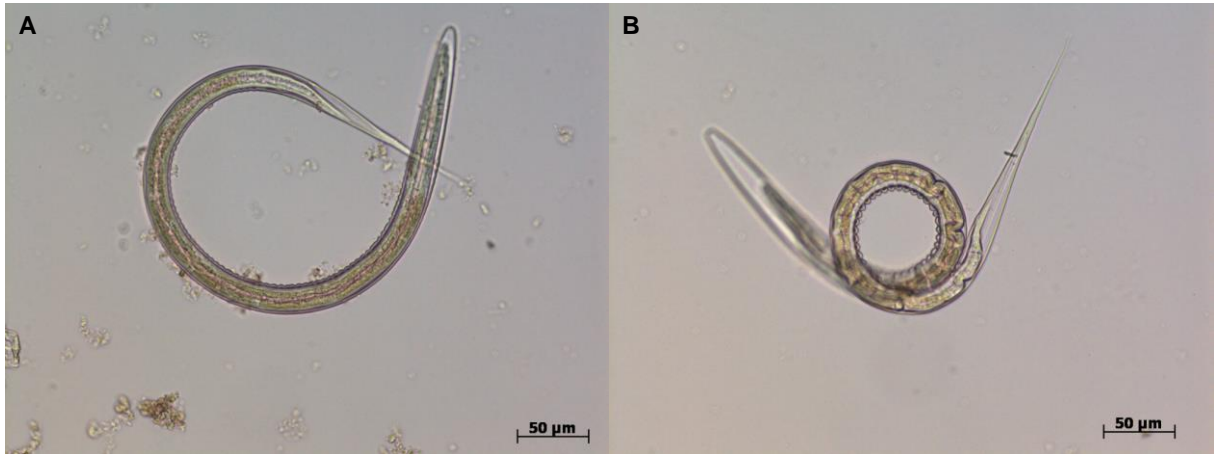
O teste somente com tampão PBS 0,01% nas concentrações de 6 e 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ demonstraram a atividade 100% nematicida do PBS 0,01% sobre larvas L_3 de nematoides gastrointestinais de ovinos.

Figura 17- Número de larvas (L_3) sobreviventes no controle e com concentrações de 6 e 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de PBS 0,01% após 48 horas de cultivo a 25°C



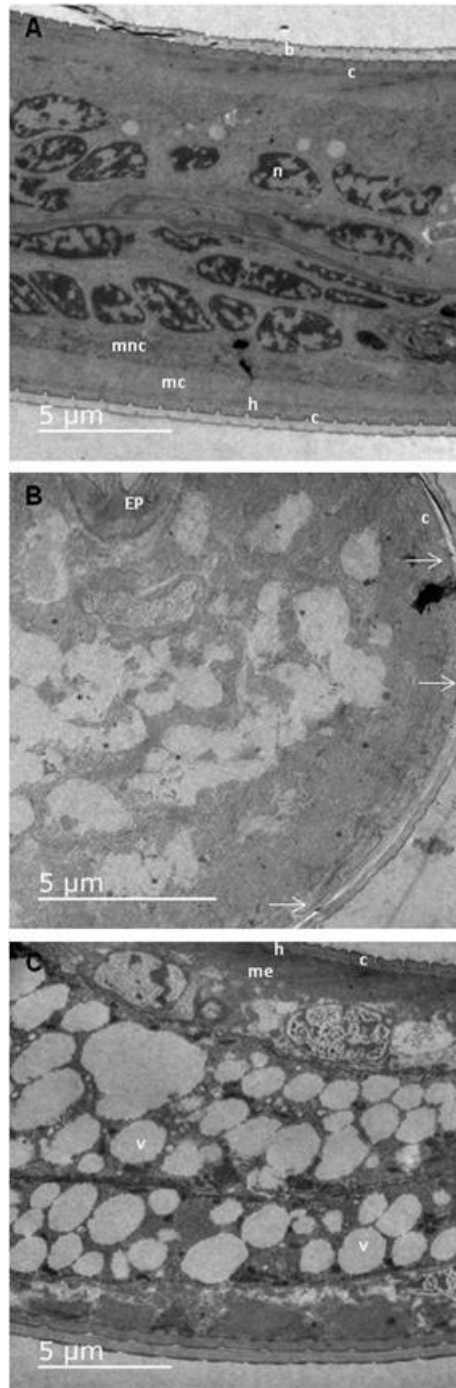
As larvas L_3 do grupo tratado nas concentrações de 0,41 e 0,69 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ apresentavam-se colapsadas, contrariamente ao que foi observado no grupo controle, onde a integridade morfológica manteve-se preservada (Figura 18).

Figura 18- Larvas (L₃) tratadas e não tratadas com albumina 2S de crambe após 48 horas de cultivo a 25° C. A) L₃ em meio a base de água destilada. B) L₃ em meio com albumina 2S oriunda de liofilização com PBS. Notar que as larvas no meio tratado apresentam-se morfologicamente alteradas em quanto às larvas não tratadas preservaram a integridade morfológica



Houve preservação da ultraestrutura no controle (Figura 19 A) enquanto no tratamento contendo albumina 2S de crambe com tampão PBS 0,01% e no tratamento apenas com tampão PBS 0,01% também foram visualizadas intensa desorganização ultraestrutural (Figura 19 B).

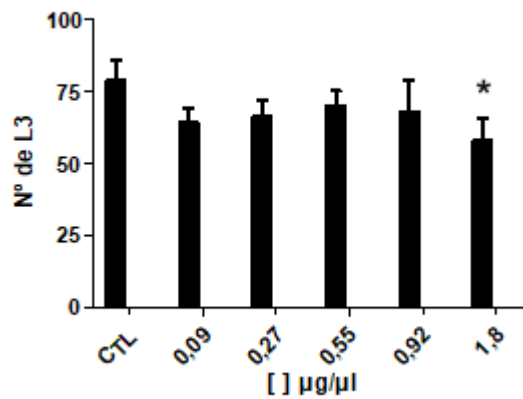
Figura 19- Ultraestrutura por M.E.T. das larvas (L₃) de nematoides gastrintestinais de ovinos não tratada (A) e tratada em meio com albumina 2S de crambe com tampão PBS 0,01% (B) e PBS 0,01% (C). As larvas foram Incubadas por 48h em B.O.D 25°C. bainha (b); cutícula (c); hipoderme (h); musculatura não contrátil (mnc); musculatura contrátil (mc); núcleo (n); , Espessamento longitudinal lateral da cutícula (EP). As setas indicam descontinuidade entre hipoderme e cutícula. Asteriscos indicam desorganização estrutural



5.5.3. Albumina 2S de pinhão-manso

Em relação ao tratamento utilizando a fração de albumina 2S de pinhão-manso purificada do HPLC, notou-se que este interferiu significativamente de forma negativa sobre a taxa de sobrevivência das larvas (L₃) somente na concentração 1,8 µg/ µl (Figura 20). Nesta concentração o número médio de L₃ sobreviventes foi de 57 ± 8 ao passo que no controle negativo foi de 79 ± 7 (P<0,05).

Figura 20- Número de larvas (L₃) sobreviventes no controle e com diferentes concentrações de Albumina 2S de pinhão-manso após 48 horas de cultivo a 25° C



6. DISCUSSÃO

A complexidade do controle de nematoides gastrintestinais em pequenos ruminantes tem aumentado em consequência da resistência destes anti-helmínticos (CEZAR; CATTO; BIANCHIN, 2008). Neste sentido, é imperativa a busca por métodos de controle que busquem alternativas aos químicos comercialmente disponíveis. Assim, foi avaliado e demonstrado o efeito nematicida das albuminas 2S frente a larvas infectantes L₃ de nematoides gastrintestinais de ovinos e nematoides de vida livre (*Panagrellus* spp.), um nematoide modelo para estudos *in vitro*.

A partir do extrato proteico das sementes de mamona, pinhão-mansão e crambe, obtivemos a separação por cromatografia de exclusão molecular de três frações proteicas denominadas F1, F2 e F3 correspondentes às massas moleculares, as quais a F2 corresponde à albumina 2S. O perfil cromatográfico das frações F2 é semelhante ao perfil conforme já descrito por Da Silva et al. (1996) para mamona e por Maciel *et al.* (2009) para pinhão-mansão.

Análise eletroforética demonstrou o perfil proteico da fração de albumina 2S de mamona, crambe e pinhão-mansão demonstraram massas moleculares próximas de 12 e 17 kDa por SDS-PAGE, a predominância de proteínas com massas moleculares próximas a 12 kDa são similares às massas moleculares correspondentes as albuminas 2S de mamona. A análise de proteínas sobre a massa molecular e a quantidade relativa existente dessa proteína específica na amostra com albuminas 2S foi investigada através do ensaio Western Blotting, na qual duas bandas bem fortes para mamona entre 12 e 17 kDa e outra entre 17 e 24 kDa, para pinhão-mansão duas bandas mais fracas foram visualizadas entre 12 e 17 kDa e outra entre 31 e 38 kDa. Shewry et al. (1995) analisou que as albuminas 2S são proteínas que geralmente têm baixa massa molecular de 12 a 15 kDa que após o processamento proteolítico saem como heterodímeros compreendendo polipeptídeos de 4 e 9 kDa estabilizados por ligações dissulfeto.

A torta de mamona é um coproduto com potencial para controle da contaminação do solo por nematoides (LORDELLO; SABINO, 1985; SILVEIRA, 2014) bem como a própria mamona tem demonstrado resistência ao parasitismo do nematoide de galhas, *Meloidogyne incognita*, em variedades de mamona (MASHELA; NTHANGENI, 2002). Atribui-se tal papel ao complexo ricina-ricinina,

compostos altamente tóxicos presentes na torta da mamona (HOFFMAN *et al.*, 2007). A ricina quando bioensaiada em nematoides em condições de laboratório apresentou resultados supressores promissores (SEVERINO, 2005; FURTADO *et al.*, 2011). A albumina 2S é outro componente presente na mamona e outras oleaginosas que pode apresentar atividade biológica sobre nematoides conforme observado neste estudo.

Através do ensaio com o nematoide de vida livre *Panagrellus* spp. foi demonstrado que a albumina 2S de mamona nas concentrações de 0,4 e 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ demonstrou potencial nematicida. *Panagrellus* spp. é um nematoide utilizado como modelo experimental demonstrando ser útil nos testes de atividade biológica de compostos sintéticos e naturais.

Nos ensaios com albuminas 2S de mamona em larvas gastrointestinais de ovinos (L_3) não houve efeitos nas concentrações de 0,6; 1,2; 2,4 e 11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. O estágio de vida de L_3 é mais resistente às adversidades do meio ambiente, pois existe uma dupla cutícula remanescente do estágio anterior e possivelmente tolerante às doses avaliadas. Enquanto que nos testes realizados com albuminas 2S de crambe apenas nas concentrações mais altas (0,41 e 0,69 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) houve diferenças significativas na contagem do número médio de L_3 sobreviventes. Porém, após retirada do tampão PBS 0,01% por meio de cromatografia utilizando Sephadex G-25, foi realizado ensaio com concentrações altas de albumina 2S de crambe nos quais observamos que não houve efeito e em contrapartida o teste com tampão PBS apenas confirmou uma ação quase imediata sobre as larvas L_3 pois mortes foram observadas após 3 horas da interação. Nos testes com pinhão-manso apenas a concentração mais alta [1,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$] apresentou efeito significativo no efeito nematicida pelo número médio de L_3 sobreviventes. Portanto, nas condições avaliadas apenas a albumina 2S extraída do pinhão-manso demonstrou de modo significativo efeito na sobrevivência das L_3 . Curiosamente, a solução tampão PBS 0,01% produziu um efeito letal nas larvas L_3 .

O estudo morfológico e ultraestrutural dos nematoides é bastante conhecido. No entanto, nenhum estudo anterior a este havia avaliado a ação da albumina 2S em nematoides. Embora, não ocorrendo variação na sobrevivência da L_3 , tratadas com albumina 2S de crambe + PBS 0,01% e mamona nitidamente observou-se um complexo de alterações nas larvas provenientes de tais tratamentos. Tais como,

espaçamento longitudinal lateral da cutícula com descontinuidade da lâmina entre a hipoderme e a cutícula, intensa vacuolização e em alguns casos, completa desorganização ultraestrutural. Talvez o período de até 48 horas da observação ainda não se reflète de fato os danos ocasionados e as larvas ainda se mantivessem com alguma sobrevida. Diferente a isto, as amostras analisadas apenas com PBS 0,01% refletiram diferenças na contagem da sobrevida tal quais as alterações ultraestruturais. É possível que albumina 2S purificada de crambe somada ao tampão PBS 0,01% tenha tido um efeito somatório já que as alterações visualizadas apenas no tratamento com PBS 0,01% divergiram um pouco.

7. CONCLUSÃO

- A albumina 2S purificada de mamona demonstrou atividade nematicida contra nematoides *Panagrellus* spp nas concentrações de 0,4 e 2 µg/ µL testadas.
- Nematoides gastrointestinais de ovinos são resistentes às albuminas 2S isoladas de sementes de mamona e crambe.
- As albuminas 2S purificadas de sementes de pinhão-manso e o tampão PBS 0,01% apresentou ação nematicida contra nematoides gastrointestinais de ovinos.
- Alterações ultraestruturais foram observadas em larvas (L₃) tratadas com albuminas 2S purificadas de crambe e mamona bem como o tampão PBS 0,01% produziram alterações ultraestruturais observadas em L₃.

REFERÊNCIAS

ABDEL GADIR, W. S. et al. (2003) 'Comparative toxicity of Croton macrostachys, Jatropha curcas and Piper abyssinica seeds in Nubian goats', **Small Ruminant Research**, 48(1), pp. 61–67. doi: 10.1016/S0921-4488(02)00181-5.

AFFANDI, I. et al. (2019) 'Growth and survival of enriched free-living nematode, Panagrellus redivivus as exogenous feeding for larvae of blue swimming crab, Portunus pelagicus', **Aquaculture Reports**, 15(February), pp. 6–11. doi: 10.1016/j.aqrep.2019.100211.

AGIZZIO, A. P. et al. (2006). The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. **Plant Science**, 171(4), 515-522.

AMARAL, J. G. C. (2003) **Variabilidade genética para características agronômicas entre progênies autofecundadas de mamona (Ricinus communis L.) cv. AL Guarany 2002**. Universidade Estadual Paulista 'Julio de Mesquita Filho'.

AMARANTE, A. F. T. (2014) **Helmintos - Classe nematoda**. São Paulo: Unesp.

ARAÚJO, F. B. de (2009) **Controle de nematóides gastrintestinais de ovinos com o uso do fungo nematófago Duddingtonia flagrans Curitiba**, Universidade Federal do Paraná.

ARAUJO, J. S. (2019) Isolamento e caracterização de albuminas 2S de sementes de crambe (*Crambe Abyssinica Host*) e avaliação das propriedades alergênicas e potencial biotecnológico. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

ARO, D. T., POLIZER, K. A., PENA, S. B. (2006) 'O agronegócio na ovinocultura de corte no Brasil', **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, 7, p. 6.

ARRUDA, F. P. de et al. (2004) 'Cultivo de pinhão manso (Jatropha curca L.) como alternativa para o semi-árido nordestino', **Rev. bras. ol. fibros**, 8(1), pp. 789–799.

BARTRAM, D. J. et al. (2012) 'The role of combination anthelmintic formulations in the sustainable control of sheep nematodes', **Veterinary Parasitology**. Elsevier B.V., 186(3–4), pp. 151–158. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.11.030.

BELTRÃO, N. E.; MELO, F. B.; CARDOSO, G. D.; SEVERINO, L. S. (2003) 'Mamona: Árvore do Conhecimento e Sistemas de Produção para o Semi- Árido Brasileiro', **Circular Técnica**, d(70), pp. 1–19.

BELTRÃO, N. E.; OLIVEIRA, M. I. P. (2009) 'Detoxicação e aplicações da torta de mamona', **Documentos 217- Embrapa**, 217, p. 35.

BORGES, E. P. et al. (2012) Culturas sucessoras a Soja, ao Milho e ao Algodão, que promovam a redução do nematóides das lesões radiculares *Pratylenchus brachyurus*. **Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Chapadão**, Chapadão do Sul, MS, p. 21.

BORGES, S. L. et al. (2015) 'Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos nos biomas Caatinga e Mata Atlântica', *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(7), pp. 643–648. doi: 10.1590/s0100-736x2015000700007.

BREITENEDER, H., MILLS, E. N. C. (2005) 'Plant food allergens - Structural and functional aspects of allergenicity', **Biotechnology Advances**, 23(6), pp. 395–399. doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.05.004.

BURNETT, G. R. et al. (2002) 'Characterization of the emulsification properties of 2S albumins from sunflower seed', **Journal of colloid and interface science**, 247(1), pp. 177–185. doi: 10.1006/jcis.2001.8093.

CARLSSON, A. S. (2009) 'Plant oils as feedstock alternatives to petroleum - A short survey of potential oil crop platforms', **Biochimie**. Elsevier Masson SAS, 91(6), pp. 665–670. doi: 10.1016/j.biochi.2009.03.021.

CEZAR, A. S., CATTO, J. B., BIANCHIN, I. (2008) 'Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: Atualidade e perspectivas', **Ciencia Rural**, 38(7), pp. 2083–2091. doi: 10.1590/S0103-84782008000700048.

CHARLES, T. P. "Verminoses dos bovinos de leite". In: Charles, T.P. & Furlong, J. (Eds.). Doenças parasitárias dos bovinos de leite. **Embrapa**, CNPGL, Coronel Pacheco, Brasil. p. 55-110, 1992.

CONDER, G.A.; CAMPBELL, W.C. (1995). Chemotherapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drug resistance. *Advances in Parasitology*, v.35, p.1-83.

COSTA, A. L. da (2002) 'Manejo sanitário e principais doenças de caprinos e ovinos', pp. 219–248.

COSTA, M. DO S. V. L. F. (2007) **Dinâmica das infecções por helmintos gastrintestinais de bovinos na região do Vale do Mucuri, MG**, *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal de Minas Gerais.

COSTA, V. M. M., SIMÕES, S. V.D., RIET-CORREA, F. (2010) 'Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil', **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 31(1), pp. 65–71. doi: 10.1590/s0100-736x2011000100010.

CRUZ, D. G. da et al. (2010) 'Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil', **Veterinary Parasitology**, 170(3–4), pp. 340–343. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.02.030.

DA SILVA, J. G. et al. Amino acid sequence of a new 2S albumin from *Ricinus communis* which is part of a 29-kDa precursor protein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 336, n. 1, p. 10–18, 1996.

FALASCA, S. L. et al. (2010) 'Crambe abyssinica: An almost unknown crop with a promissory future to produce biodiesel in Argentina', **International Journal of Hydrogen Energy**. Elsevier Ltd, 35(11), pp. 5808–5812. doi: 10.1016/j.ijhydene.2010.02.095.

FAO (2003) 'Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina', **Salud Animal**, 157(July 2014), p. 59.

FILHO, A. S. et al. (1977) 'Melhoramento da mamoneira', **Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência.**, pp. 35–45.

FURTADO, R. F. et al. (2011) 'Produção de anticorpos policlonais anti-ricina', **Ciencia e Agrotecnologia**, 35(1), pp. 124–130. doi: 10.1590/S1413-70542011000100015.

GENOV,N. et al. A novel thermostable inhibitor of trypsin and subtilisin from the seeds of *Brassica nigra*: amino acid sequence, inhibitory and spectroscopic properties and thermostability. **Biochemistry and Biophysic Acta**, n. 1341,p. 157-164, 1997

GOMESA, E. H. et al. (2019) 'Role of *Synadenium grantii* latex proteases in nematocidal activity on *meloidogyne incognita* and *Panagrellus redivivus*', **Brazilian Journal of Biology**, 79(4), pp. 665–668. doi: 10.1590/1519-6984.188129.

GOULART, A. M. C. (2008) 'Aspectos gerais sobre nematóides das lesões radiculares (gênero *Pratylenchus*)', **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 1, p. 30.

HARDMAN, L. L. et al. (1989) **Alternative Field Crops Manual, Alternative Field Crops Manual**. Available at:<http://docshare03.docshare.tips/files/4774/47746137.pdf> (Accessed: 13 May 2019).

HICKMAN, C. P. et al. **Princípios Integrados de Zoologia**. 15° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

HOFFMAN, L. V. et al. (2007) 'Ricina: um Impasse para Utilização da Torta de Mamona e suas Aplicações', **Embrapa**, 1, p. 26.

HOLTZ, A. M. et al. (2015) 'Estudo do potencial de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) sobre o manejo da cochonilha da roseta', *Revista Agrogeoambiental*, 8(3), pp. 10–23. doi: 10.18406/2316-1817v8n32016840.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo demográfico**: resultados preliminares – São Paulo. Rio de Janeiro, 2017.

JAEHN, A.; LAMBERT, N. S. (1984) 'Uso de torta de mamona como nematocida em viveiro de café', **Nematologia Brasileira**, 8, pp. 285–294.

JASPER, S. P. et al. (2010) 'Análise energética da cultura do crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) produzida em plantio direto', **Engenharia Agrícola**, 30(3), pp. 395–403.

JUNIOR, A. C. C. (2016) **Caracterização da ovinocultura do município de Bom Retiro-SC**. Universidade Federal de Santa Catarina.

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

LARA-FIOREZE, A. C. C. et al. (2013) 'Genetic diversity among progenies of *Crambe abyssinica Hochst* for seed traits', **Industrial Crops and Products**. Elsevier B.V., 50, pp. 771–775. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.07.039.

LEHMANN, K. et al. (2006) 'Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions', **Biochemical Journal**, 395(3), pp. 463–472. doi: 10.1042/BJ20051728.

LEPPIK, E. E.; WHITE, G. A. (1975) 'Preliminary assessment of crambe germplasm resources', **Euphytica**, 24, pp. 681–689.

LINNAEUS, C. (1767). *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Editio duodecima, **Reformata**, pp. 533-1327.

LOPES, M. L. S. (2013) **Detoxicação e análise da qualidade proteica do farelo do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)**. Available at: <https://agrogeoambiental.ifsuldeminas.edu.br/index.php/Agrogeoambiental/article/view/840>.

LORDELLO, R. R. A.; SABINO, N. P. (1985) 'Efeito do controle de nematóides na qualidade da fibra do algodoeiro', **Microbiologia Madrid**, 44 (2), pp. 695–699.

MACHADO, O. L.; SILVA JÚNIOR, J. G. (1992). An allergenic 2S storage protein from *Ricinus communis* seeds which is a part of the 2S albumin precursor predicted by cDNA data. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas, 25(6), 567–82.

MACIEL, F. M. et al. (2009) 'A new 2S albumin from *Jatropha curcas* L. seeds and assessment of its allergenic properties', **Peptides**, 30(12), pp. 2103–2107. doi: 10.1016/j.peptides.2009.08.008.

MARIA-NETO, S. et al. (2011) 'Bactericidal activity identified in 2S albumin from sesame seeds and in silico studies of structure-function relations', **Protein Journal**, 30(5), pp. 340–350. doi: 10.1007/s10930-011-9337-x.

MARQUES, D. D. A.; FERRARI, R. A. (2008) 'O papel das novas biotecnologias no melhoramento genético do pinhão manso', **Plant Cell**, 70(2), pp. 65–67.

MARTÍNEZ-HERRERA, J. et al. (2006) 'Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico', **Food Chemistry**, 96(1), pp. 80–89. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.01.059.

MARTINS, C. C.; MACHADO, C. G.; CAVASINI, R. (2008) 'Temperatura e substrato para o teste de germinação de sementes de pinhão-manso', **Ciencia e Agrotecnologia**, 32(3), pp. 863–868.

MASHELA, P. W.; NTHANGENI, M. E. (2002) 'Efficacy of *Ricinus communis* fruit meal with and without *Bacillus* species on suppression of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato', **Journal of Phytopathology**, 150(7), pp. 399–402. doi: 10.1046/j.1439-0434.2002.00770.x.

MASSOURA, E. et al. (1998) 'Proteins from *Crambe abyssinica* Oilseed . II . Biochemical and Functional Properties', **Agrotechnological Research Institute (ATO-DLO)**, 75(7), pp. 329–335.

MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B. G. (2009) 'Uso Potencial E Toxidez Da Torta De Pinhão Manso', **Embrapa**, p. 8.

MOLENTO, M. B., (2004) 'Resistência de helmintos em ovinos e caprinos'. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.82-87.

MOLENTO, M. B. (2005) 'Resistência parasitária em helmintos de eqüídeos e propostas de manejo', **Ciência Rural**, 35(6), pp. 1469–1477. doi: 10.1590/s0103-84782005000600041.

MOLENTO, M. B. et al. (2011) 'Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America', **Veterinary Parasitology**, 180(1–2), pp. 126–132. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.05.033.

MONTEIRO, M. V. B.; RODRIGUES, S. T.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. (2012) 'Plantas Medicinais Utilizadas na Medicina Etnoveterinária Praticada na Ilha do Marajó', **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 1, p. 30.

MOTEIRO, M. V. B. (2010) **Estudo etnoveterinário de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica**. Universidade Estadual do Ceará.

MULDER, J. H.; MASTEBROEK, H. D. (1996) 'Variation for agronomic characteristics in *Crambe hispanica*, a wild relative of *Crambe abyssinica*', **Euphytica**, 89(2), pp. 267–278. doi: 10.1007/BF00034615.

NÄREAHO, A.; VAINIO, K; OKSANEN, A. (2011) 'Impaired efficacy of ivermectin against *Parascaris equorum*, and both ivermectin and pyrantel against strongyle infections in trotter foals in Finland', **Veterinary Parasitology**, 182(2–4), pp. 372–377. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.05.045.

NASCIMENTO, V. V. (2009) Caracterização de albuminas 2S de *Ricinus communis* L. como inibidores de α -amilase e relação estrutura-atividade de suas principais isoformas, Ric c 1 e Ric c 3. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6a ed. Porto Alegre: W.H.Freeman and Company, 2014.

OLIVA, A. C. E. (2010) **Qualidade de sementes de crambe submetidas a métodos de secagem e períodos de armazenamento**. Universidade Estadual Paulista. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

OLIVEIRA, L. M. B. et al. (2011) 'Plantas taniníferas e o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes', **Ciência Rural**, 41, pp. 1967–1974.

OSBORNE, T. B. (1912) **The Vegetable Proteins**. 1°. Edited by Longmans. New York.

OTAKE, M. O. et al. (2014) 'Nematode infection among ruminants in monsoon climate (Ban-Lahanam, Lao PDR) and its role as food-borne zoonosis.', **Brazilian Journal Of Veterinary Parasitology: Órgão Oficial Do Colégio Brasileiro De Parasitologia Veterinária**, 23(0103–846X), pp. 80–84. doi: 10.1590/S1984-29612014011.

QUADROS, D. G. (2004) **Nematodioses de ovinos e caprinos mantidos em pastagens no oeste da Bahia**. Universidade Estadual Paulista 'Julio de Mesquita Filho'.

QUADROS, D. G. (2005) 'Sistemas de produção de ovinos e caprinos de corte', p. 21.

RAKSHIT, K. D. et al. (2008) 'Toxicity studies of detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats', **Food and Chemical Toxicology**. Elsevier Ltd, 46(12), pp. 3621–3625. doi: 10.1016/j.fct.2008.09.010.

REIS, I. F. (2004) *Controle de nematóides gastrintestinais em pequenos ruminantes: Método estratégico versus FAMACHA*.

REY, L. **Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos Ocidentais**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

RIBEIRO, S. F. F. et al. (2012) 'Antifungal and other biological activities of two 2S albumin-homologous proteins against pathogenic fungi', **Protein Journal**, 31(1), pp. 59–67. doi: 10.1007/s10930-011-9375-4.

RIBEIRO, S. M. et al. (2011) 'Identification of a *Passiflora alata* Curtis dimeric peptide showing identity with 2S albumins', **Peptides**. Elsevier Inc., 32(5), pp. 868–874. doi: 10.1016/j.peptides.2010.10.011.

ROCHA, L. O. (2016) *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf e *Allium sativum* L.: Avaliação da Atividade Nematicida, Toxicidade e Alterações Morfológicas e Ultraestruturais sobre Nematoides Gastrintestinais. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

ROBERT, F. H. S., O'SULLIVAN, P. J. "Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting tract of cattle". **Australian Journal of Agricultural Research**, v.1, p.99-102, 1950.

SALGADO, J. A.; SANTOS, C. P. (2016) 'Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil', **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, 25(1), pp. 3–17. doi: 10.1590/S1984-29612016008.

SANTOS, P. R. et al. (2015) 'Nematódeos Gastrintestinais de Bovinos - Revisão', **Revista Científica de Medicina Veterinária**. Ponta Grossa, PR, 24, p. 21.

SANTOS, P. A. et al.(2013) Farelo de manona da alimentação de não ruminantes, **Revista Eletrônica Nutritime**, 10(217), pp. 2814–2827.

SANTOS, K. A. et al. (2014) Caracterização do óleo de crambe (*Crambe abyssinica*) extraído com propano em condições subcríticas, XX Congresso brasileiro de engenharia química. doi: 10.5151/chemeng-cobeq2014-1385-19553-158900.

SCZESNY-MORAES, E. A. et al. (2010) 'Resistência anti-helmíntica de nematóides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul', **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 30(3), pp. 229–236.

SEVERINO, L. S. et al. (2006) Mamona: O produtor pergunta, a Embrapa responde. 1°. Edited. Brasília, DF: **Embrapa Informação tecnológica**; Embrapa Algodão.

SEVERINO, L. S. (2005) O que sabemos sobre a torta de mamona, Documentos 134 - **Embrapa**, 134, p. 31.

SHEWRY, P. R.; NAPIER, J. A.; TATHAM, A. S. (1995) 'Seed storage proteins: Structures and biosynthesis', **Plant Cell**, 7(7), pp. 945–956. doi: 10.1105/tpc.7.7.945.

SILVA, T. O. et al. (2017) Habronemose cutânea equina – Relato de caso, **Revista científica de medicina veterinária**, 29, p. 6.

SILVEIRA, A. (2014) 'Potencial da torta de mamona no mercado', **Agroenergia em Revista**, pp. 56–57.

Smith, P. K. et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, 150(1), 76-85.

SOBRINHO, A. G. S. et al. (2005) Características de Qualidade da Carne de Ovinos de Diferentes Genótipos e Idades ao Abate, **R. Bras. Zootec.**, 34(3), pp. 1070–1078.

SOUZA, P. F. N. et al. (2016) A 2S albumin from the seed cake of *ricinus communis* inhibits trypsin and has strong antibacterial activity against human pathogenic bacteria, **Journal of Natural Products**, 79(10), pp. 2423–2431. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b01096.

SOUZA, P. F. N. (2012) Purificação, caracterização bioquímica e atividade antimicrobiana de uma nova albumina 2s da torta da mamoneira (*Ricinus communis* L.), Com atividade inibitória contra tripsina. Universidade Federal do Ceará.

STOCK, S. P; NADLER, S. A. (2006) 'Morphological and molecular characterisation of *Panagrellus* spp. (Cephalobina: Panagrolaimidae): Taxonomic status and phylogenetic relationships', **Nematology**, 8(6), pp. 921–938. doi: 10.1163/156854106779799277.

SUBRAMANYAM, K. et al. (2010) 'Evaluation of genetic diversity among *Jatropha curcas* (L.) by RAPD analysis', **Indian Journal of Biotechnology**, 9(3), pp. 283–288.

TERRAS, F.R.G. et al. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativas* L.) seeds. **Journal of Biology Chemistry**, v. 267, p. 15301-15309, 1992.

TERRAS, F.R.G. et al. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1311-1319, 1993.

THORPE, S. C. et al. Allergy to castor bean II – identification of the major allergens in castor bean seeds. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 82, p. 67-62. 1988.

TORRES-ACOSTA, J. F. J. et al. (2012) 'Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent', **Veterinary Parasitology**. Elsevier B.V., 189(1), pp. 89–96. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.03.037.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1979.

VIANA, J. G. A. (2008) 'Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil', **Revista Ovinos**, 12, p. 9.

VIANA, O. H. (2013) Cultivo de crambe na região oeste do Paraná. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

VIEIRA, L. da S. (2004) 'Importância das endoparasitoses gastrintestinais nas explorações de caprinos e ovinos', p. 21. Universidade Estadual do Ceará.

VIEIRA, L. S; XIMENES, L. J. F. (2001) 'Resistencia genética ao parasitismo por nematoides gastrintestinais em pequenos ruminantes do Brasil: Panorama atual', **Embrapa**, p. 20.

WALKER, J. T. (1996) 'Crambe and rapeseed meal as soil amendments: Nematicidal potential and phytotoxic effects', **Crop Protection**, 15(5), pp. 433–437. doi: 10.1016/0261-2194(96)00001-4.