



Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Mestrado

Poli-peptídeos exsudados de sementes de *Mimosa caesalpinifolia* inibem a motilidade de *Caenorhabditis elegans* e induzem modificações ultraestruturais e biomecânicas na superfície do nematoide

Wallyson André dos Santos Bezerra

São Luís / MA
2021

Wallyson André dos Santos Bezerra

Polipectídeos exsudados de sementes de *Mimosa caesalpinifolia* inibem a motilidade de *Caenorhabditis elegans* e induzem modificações ultraestruturais e biomecânicas na superfície do nematoide

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão.

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

Prof.^a Dr.^a. Alexandra Martins dos Santos Soares

São Luís / MA
2021

Wallyson Bezerra

Polipeptídeos exsudados de sementes de *Mimosa caesalpinifolia* inibem a motilidade de *Caenorhabditis elegans* e induzem modificações ultraestruturais e biomecânicas na superfície do nematoide– São Luís: MA, 2021.

XX f.: il.

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

Wallyson André dos Santos Bezerra

Poli-peptídeos exsudados de sementes de *Mimosa caesalpinii* folia inibem a motilidade de *Caenorhabditis elegans* e induzem modificações ultraestruturais e biomecânicas na superfície do nematoide

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

Aprovada em 06 / agosto / 2021

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a. Alexandra Martins dos Santos Soares
Universidade Federal do Maranhão

Prof.^a Dr.^a. Olga Lima Tavares Machado
Universidade Estadual do Norte Fluminense

Prof. Dr. Ivo Alexandre Leme da Cunha
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Livio Martins Costa Junior
Universidade Federal do Maranhão

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me dado a vida e por iluminar meu caminho em todos os momentos dando-me coragem e força de vontade para enfrentar todas as problemáticas.

Agradeço à minha Família por estar sempre ao meu lado, me apoiando e torcendo pelo meu sucesso. Aos meus pais (Francisco e Luzia) que me deram todo apoio necessário para me incentivar a buscar sempre mais. Especialmente as minhas Tias (Mazé e Marina), com todo seu carinho que foi alicerce para meu crescimento. Ao meu irmão, primos (as), tios e tias que de alguma forma me ajudaram a chegar onde eu estou. Aos meus amados Avós, exemplos de sabedoria e cumplicidade.

Aos meus amigos, por estarem sempre presente em minha vida, alegrando meus momentos difíceis e participando das minhas vitórias.

À minha Orientadora, Dr^a. Alexandra Martins dos Santos Soares. Agradeço primeiramente por ter me recebido no seu laboratório. Muito obrigado pela confiança que me foi depositada, pelo respeito com que sempre me tratou e pela amizade tão agradável. MUITÍSSIMO obrigado pelos inúmeros ensinamentos e por acreditar no meu potencial.

Ao professor Dr. Livio Martins Costa Júnior e toda sua equipe. À Prof.^a Dr. Luciana, Dr. Carol, Dr. Pedro, Dr. Tadeu, agradeço pelo esforço e dedicação me apoiando na condução até a finalização deste trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Bioquímica Vegetal por terem me ensinado e acompanhado em diversos experimentos, pela disponibilidade e paciência em me tirar dúvidas e por toda a ajuda, muito obrigado.

À FAPEMA e CNPq, pela concessão de bolsa e pelo suporte financeiro.

Sumário

Lista de siglas e abreviaturas.....	viii
Lista de ilustrações	ix
Lista de tabelas	x
Resumo	xi
Abstract	xii
1 Introdução	13
2 Referencial teórico	15
2.1 Infecções por nematoides e drogas anti-helmínticas	15
2.2 <i>Caenorhabditis elegans</i>	16
2.3 Peptídeos, polipeptídeos e proteínas bioativas contra nematoides	17
2.4 <i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> Benth.....	18
3 Objetivos.....	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4 Material e métodos	22
4.1 Material biológico	23
4.1.1 Material vegetal	23
4.1.2 Cepa e cultura de <i>Caenorhabditis elegans</i>	23
4.2 Coleta de exsudatos de sementes de <i>M. caesalpiniiifolia</i> (McSEX) e preparação das frações proteicas	24
4.3 Análise de Mc.PEP por espectrometria de massa (MS)	25
4.4 Ensaio anti-helmínticos contra <i>Caenorhabditis elegans</i>	25
4.5 Influência de Mc.PEP sobre a estrutura da cutícula de <i>Caenorhabditis elegans</i>	25
4.5.1 Análise por microscopia óptica	26
4.5.2 Análise por microscopia de força atômica	26
4.6 Ensaio de hemólise	26
4.7 Análise estatística	27
5 Resultados	28
5.1 Determinação do teor de proteína de exsudatos e frações de sementes	28
5.2 Avaliação da motilidade em <i>Caenorhabditis elegans</i>	28
5.3 Propriedades ultraestruturais e nanomecânicas de <i>Caenorhabditis elegans</i> tratado com Mc.PEP	29

5.4 Análise proteômica de <i>Mc</i> .PEP	31
5.5 Avaliação da atividade citotóxica por células de mamíferos	34
6 Discussão	35
7 Conclusão e perspectivas	38
Referências bibliográficas.....	39

Lista de siglas e abreviaturas

BSA	Albumina sérica bovina.
CLA	Cromatografia líquida de alta eficiência.
<i>McSEX</i>	Exsudado de semente obtido em pH 7.0 a 25 °C.
<i>McSEX</i> _{90%}	Fração proteica obtida em pH 7.0 a 25 °C.
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% da população.
DP	Desvio padrão.
MgP g ⁻¹	Miligramas de proteínas por grama de sementes madura.
DTNs	Doenças tropicais negligenciadas.
GINs	Nematoides gastrointestinais.
NGM	Nematode growth media.
<i>McF.30-10</i>	Fração proteica obtida a partir de processos de ultrafiltração de membrana com corte de 30 KDa e 10 KDa
<i>Mc.PEP</i>	Fração polipeptídica obtida a partir de processos de ultrafiltração de membrana com corte de 10KDa e 2KDa.
PH	Potencial Hídrogênico.
TFF	Filtração de fluxo tangencial

Lista de ilustrações

Figura 1. Ciclo de vida de <i>C. elegans</i> hermafrodita a 20 °C. O ciclo de vida reprodutivo da hermafrodita inclui 4 estágios larvais (L1 a L4). A larva <i>Dauer</i> é um estágio de diapausa, representando um estágio L3 alternativo, que é introduzido quando ocorrem condições desfavoráveis, como aglomeração ou baixa disponibilidade de alimentos. Fonte: LIAO, 2018.....	17
Figura 2. Exemplares de sementes da espécie <i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> Benth. Fonte: Próprio autor.....	20
Figura 3. Fluxograma representando as principais etapas da metodologia.....	22
Figura 4. Estrutura da cutícula de <i>C. elegans</i> . A) Imagem óptica de <i>Caenorhabditis elegans</i> após tratamento tampão M9 (controle). B) <i>C. elegans</i> tratado com <i>Mc.PEP</i> (1,34 µg mL ⁻¹). Ampliação total: 100 x. Os quadrados amarelos nas imagens A e B indicam a região da cutícula onde as imagens foram obtidas para microscopia de força atômica (AFM). C) Imagens de <i>C. elegans</i> após tratamento com controle (tampão M9) e D) <i>Mc.PEP</i> (1,34 µg mL ⁻¹); e seus respectivos mapas tridimensionais (E e F).....	30
Figura 5. Dados de rigidez (A) e adesão (B) da cutícula de <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto incubado com o tampão M9 (controle) e com <i>Mc.PEP</i> (1,34 µg mL ⁻¹). *Denota diferença significativa (p < 0.05).....	31
Figura 6. Atividade hemolítica de <i>Mc.PEP</i> na concentração de 45 µg mL ⁻¹ contra eritrócitos bovinos.....	34

Lista de tabelas

Tabela 1. Teor de proteínas dos exsudatos de sementes de <i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> (McSEX) e as frações McSEX _{90%} ; McF.30-10 e Mc.PEP, expresso em miligramas de proteínas por grama de semente madura (mgP g ⁻¹ semente).....	28
Tabela 2. Efeito de McSEX, McSEX _{90%} , McF.30-10 e Mc.PEP sobre a motilidade de <i>C. elegans</i>	28
Tabela 3. Polipeptídeos identificados em Mc.PEP por LC-ESI-MS / MS.....	32

Resumo

As infecções por nematoides induzem morbidade e mortalidade em todo o mundo, além de grandes gastos econômicos devido aos tratamentos. Pesquisas que tenham como objetivo a identificação de novos produtos anti-helmínticos são importantes para combater o desenvolvimento de resistência aos principais medicamentos em uso atualmente. Os produtos naturais têm sido alvo de estudos de prospecção de novas drogas contra nematoides e os exsudatos de sementes de plantas, por possuírem uma ampla diversidade de compostos bioativos, apresentam-se como uma fonte potencial de compostos anti-helmínticos. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos das proteínas e polipeptídeos exsudados de sementes de *Mimosa caesalpiniiifolia* sobre o nematoide modelo *Caenorhabditis elegans*. Após imersão das sementes em tampão fosfato de sódio, pH 7.0, contendo NaCl e MgSO₄, por 24 h, a 25 °C, as proteínas e polipeptídeos exsudados (denominados McSEX) foram fracionados por meio de precipitação com sulfato de amônio e etapas de ultrafiltração (cut-off 30, 10 e 2 kDa), obtendo-se as frações McSEX_{90%}, McF.30-10 e Mc.PEP. O efeito anti-helmíntico do exsudato e das frações foi verificado através do teste de inibição de motilidade de *C. elegans*. A fração rica em polipeptídeos, Mc.PEP, foi analisada por espectrometria de massas e sua ação sobre *C. elegans* foi avaliada por microscopia de força atômica (AFM). Mc.PEP apresentou maior eficácia em inibir a motilidade de *C. elegans*, com IC₅₀ de 1,34 µg mL⁻¹, sendo capaz de alterar a ultraestrutura e as propriedades mecânicas do nematoide. Conclui-se que os exsudatos de sementes de *M. caesalpiniiifolia* causam efeitos nocivos no nematoide *C. elegans*. As proteínas e polipeptídios constituintes dos exsudatos são macromoléculas potenciais para o controle de nematoides parasitos.

Palavras-chave: Exsudação de sementes; peptídeos anti-helmínticos; nematóides.

Abstract

Nematode infections induce morbidity and mortality worldwide, leading to large economic costs due to treatments. Research aiming to identify new anthelmintic products is important to combat the development of resistance to the drugs that are currently in use. Natural products have been the target of studies for prospecting new drugs against nematodes. Plant seed exudates, which possess a wide range of bioactive compounds, are a potential source of anthelmintic compounds. This study aimed to evaluate the effects of proteins and polypeptides exuded from *Mimosa caesalpiniiifolia* seeds on the model nematode *Caenorhabditis elegans*. The seeds were placed in tubes with sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing NaCl and MgSO₄, for 24 h at 25 °C. The exuded proteins and polypeptides (named McSEX) were fractionated by precipitation with ammonium sulfate and ultrafiltration steps (cut-off 30, 10 and 2 kDa), obtaining the fractions McSEX_{90%}, McF.30-10 and Mc.PEP. The anthelmintic effect of the exudate and fractions was verified through the *C. elegans* motility inhibition test. The polypeptide-rich fraction, Mc.PEP, was analyzed by mass spectrometry and its action on *C. elegans* was evaluated by atomic force microscopy (AFM). Mc.PEP showed higher efficacy in inhibiting *C. elegans* motility, with IC₅₀ of 1.34 µg mL⁻¹, being able to change the ultrastructure and mechanical properties of the nematode. In conclusion, *M. caesalpiniiifolia* seed exudates cause harmful effects on the nematode *C. elegans*. The proteins and polypeptides present in the exudates are potential macromolecules for the control of parasitic nematodes.

Keywords: Seed exudation; anthelmintic peptides; nematodes.

1 Introdução

As infecções causadas por helmintos gastrointestinais constituem um dos principais problemas de saúde pública. Embora de ocorrência comum, por atingirem mais de 24% da população mundial, as infecções por helmintos estão entre as doenças tropicais negligenciadas (DTNs) (DUDLOVÁ et al., 2016; FLAMMER et al., 2020; ONG et al., 2018; FEASEY et al., 2010). As DTNs ocorrem principalmente nas populações pobres do mundo de países de baixa e média renda e as indústrias mostram interesses restritos em investimentos para desenvolver novos medicamentos e diagnósticos para essas doenças, pois representam mercados de baixo lucro (BARDA et al., 2015).

Menos de 1% da pesquisa em saúde global é direcionada para doenças causadas por nematoides e para a produção e desenvolvimento de novos medicamentos para esse fim (VALENTINE et al., 2016). As estimativas indicam uma perda de produtividade globalmente de até US\$ 138.9 bilhões anuais devido a doenças causadas por nematoides (BARTSCH et al., 2016).

A infecção por nematoide também é um problema na indústria de gado e pequenos ruminantes em todo o mundo. Por exemplo, *Haemonchus contortus* é reconhecido como o nematoide parasito economicamente mais importante em zonas endêmicas, principalmente por sua ocorrência comum e potencial para provocar altas taxas de mortalidade em pequenos ruminantes (BESIER et al., 2016). É importante ressaltar que o uso indiscriminado de anti-helmínticos tem contribuído para a seleção e estabelecimento de parasitos resistentes aos anti-helmínticos atuais. Portanto, a busca por novos medicamentos e o desenvolvimento de terapias alternativas são necessários (FIGUEIREDO et al., 2018; GILLAN et al., 2017).

Caenorhabditis elegans é um nematoide de vida livre que pertence à ordem Rhabditida, encontrado naturalmente em solos de clima temperado (KATIKI et al., 2011). *C. elegans* atende a muitos dos critérios para ser empregado como organismo modelo em testes *in vitro* porque é economicamente viável, está prontamente disponível e pode ser facilmente manuseado (HAHNEL et al., 2020; LIAO et al., 2018). *C. elegans* compartilha muitas semelhanças com outros parasitos e os efeitos de vários compostos anti-helmínticos foram analisados em relação a este nematoide como um modelo (BLAXTER et al., 2011). Assim, neste estudo, *C. elegans* será utilizado com modelo experimental.

Durante o processo de germinação, as sementes maduras exsudam diversos compostos químicos. Entre eles, proteínas, polipeptídeos e peptídeos com atividades biológicas relevantes contra bactérias, fungos, nematoides parasitos de plantas e animais

(LANOUE et al., 2010; NÓBREGA et al., 2005; ROCHA et al., 2015; LICÁ et al., 2018). Por exemplo, proteínas exsudadas de sementes maduras de *Myracrodruon urundeuva* impedem o desenvolvimento larval do nematoide *H. contortus* (SOARES et al., 2018).

Mimosa caesalpiniiifolia Benth., popularmente conhecida como "sabiá" ou "sansão do campo", pertence à família Leguminosae, subfamília Mimosoideae. É uma árvore nativa de rápido crescimento do nordeste do Brasil, usada como forragem entre outras utilidades (HERRERA et al., 2021; ABREU et al., 2019; TAVARES et al., 2012). Diante da necessidade de identificação de novos compostos bioativos contra nematoides e considerando o crescimento constante dos mercados de proteínas devido a sua natureza em geral não-tóxica e também aos seus reduzidos efeitos colaterais adversos no tratamento de doenças (HERNANDEZ-LEDESMA et al., 2017), recentemente, foi verificado que proteínas presentes em exsudatos de sementes de *M. caesalpiniiifolia* obtidos em pH 5,0, a 10 °C, inibem o desembainhamento de larvas de *Haemonchus contortus* (LICÁ et al., 2021).

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito anti-helmíntico de proteínas e polipeptídeos presentes nos exsudatos de sementes de *M. caesalpiniiifolia* sobre o modelo de nematoide *C. elegans*.

2 Referencial teórico

2.1 Infecções por nematoides e drogas anti-helmínticas

Entre as doenças tropicais negligenciadas, as causadas por nematoides gastrointestinais (GINs) acometem o maior número de pessoas, com uma estimativa global de mais de 1,5 bilhão de indivíduos infectados (CHEONG et al., 2021). Particularmente as espécies do Filo Nematoda, são um sério problema de saúde pública, visto que infectam bilhões de pessoas e animais domésticos por todo mundo, além de provocarem alta morbidade, incapacidade e, conseqüentemente, grande impacto socioeconômico (BENVEGNÚ et al., 2018; VLAS et al., 2016).

Essas doenças, que representam um problema na saúde pública, são registradas como indicadores de desenvolvimento socioeconômico de um país. Afetam especialmente indivíduos jovens, iniciando, além de problemas gastrintestinais, menor rendimento corporal e, conseqüentemente, atraso no progresso escolar. No Brasil, as parasitoses intestinais apresentam alta prevalência em populações de nível socioeconômico menor, relacionado às precárias condições de saneamento, educação e habitação, contribuindo com o agravamento dos quadros de anemia, desnutrição e atraso no desenvolvimento físico (FENALTI et al., 2016; BACELAR et al., 2018).

As drogas utilizadas para tratar tais infecções são normalmente os anti-helmínticos sintéticos. A passagem da droga pelas estruturas do parasito possibilita que ela alcance um receptor específico e cause seu efeito. Por exemplo, foi constatado que lactonas macrocíclicas podem afetar a função neuronal, induzindo paralisia do nematoide (HAHNEL et al., 2020). Essas lactonas agirão aumentando a permeabilidade dos íons cloro (Cl^-) no músculo, potencializando os canais iônicos mediados pelo glutamato (GluCl) (OSÓRIO et al., 2020).

Ao longo de muitos anos, os anti-helmínticos sintéticos mostraram ser eficazes no combate dessas infecções, entretanto o desenvolvimento global de resistência a estes medicamentos em comunidades de nematoides, é uma situação preocupante. A resistência pode ser conceituada como a capacidade de uma população de parasitos sobreviver depois da utilização de doses do medicamento que são letais a populações susceptíveis (OLIVEIRA, 2017; JACKSON et al., 2012). Existem vários mecanismos de resistência aos anti-helmínticos, como por exemplo: mudança no alvo molecular, que passa a não reconhecer o medicamento; alteração no metabolismo que inativa ou remove a droga; mudança na distribuição do medicamento no organismo alvo, impedindo o acesso do medicamento ao seu local de ação; ou deleção ou mutação de aminoácido (s) (AA) no

gene que codifica o alvo da droga (JABBAR et al., 2006; GILLEARD, 2006). Diante deste cenário, a descoberta de novos princípios anti-helmínticos se torna fundamental.

2.2 *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans é um nematoide de vida livre, que tem sido vastamente utilizado como organismo modelo para diferentes tipos de pesquisa. Várias são as propriedades experimentais que afirmam o *C. elegans* um modelo animal muito sucedido e com um número expressante de publicações em biologia do desenvolvimento, genética, envelhecimento e de ecotoxicologia (PEÑA et al., 2017; CORSI, 2006; DENT et al., 1997; BRENNER, 1974).

Dentre as vantagens de *C. elegans* ser utilizado como modelo estão: pequeno comprimento (~1mm), o que propicia a fácil manutenção de grandes quantidades de espécimes (10000 vermes/placa) em placas de petri NGM (Nematode Growth Media) com *E. coli*; alta capacidade reprodutiva, já que um hermafrodita produz entre 200 e 300 descendentes, e quando um macho cruza com um hermafrodita esta quantidade pode ultrapassar 1000 (NAYAK et al., 2004; ANTOSHECHKIN; STERNBERG, 2007; GARCÍA-GONZÁLEZ AP, WALHOUT, 2017).

Além disso, seu reduzido ciclo de vida, possibilita a realização de estudos associados à longevidade em um espaço temporal praticamente inviável em modelos mamíferos clássicos e, numerosas possibilidades relacionadas à genética, visto que cerca de 60% dos genes do *C. elegans* apresentam homólogos em mamíferos (KALETTA; HENGARTER, 2006).

Esse modelo experimental é ainda mais adequado para determinar o potencial anti-helmíntico, pois partilha propriedades morfológicas, genéticas e neurológicas com nematoides parasitos (KONG et al., 2016). Como os nematoides compartilham diversos mecanismos, diferentes compostos tendem a atuar sobre estes organismos de forma similar, sendo estes parasitos ou não (LIMA, 2013; SIMPKIN; COLES, 1981).

C. elegans pode ser hermafrodita autofecundante ou machos, mas os machos representam cerca de 0,1 % da população. Esse nematoide possui um pequeno ciclo de vida, de aproximadamente 3 dias, para se desenvolver em adultos férteis (Figura 1), e uma expectativa de vida de aproximadamente 3 semanas (LIAO, 2018).

Possui um sistema nervoso contendo 302 neurônios e, além disso, *C. elegans* contém muitos órgãos e tecidos diferentes, abrangendo músculo, hipoderme, intestino, sistema reprodutor, sistema secretor-excretor e glândulas (FÉLIX; BRAENDLE, 2010).

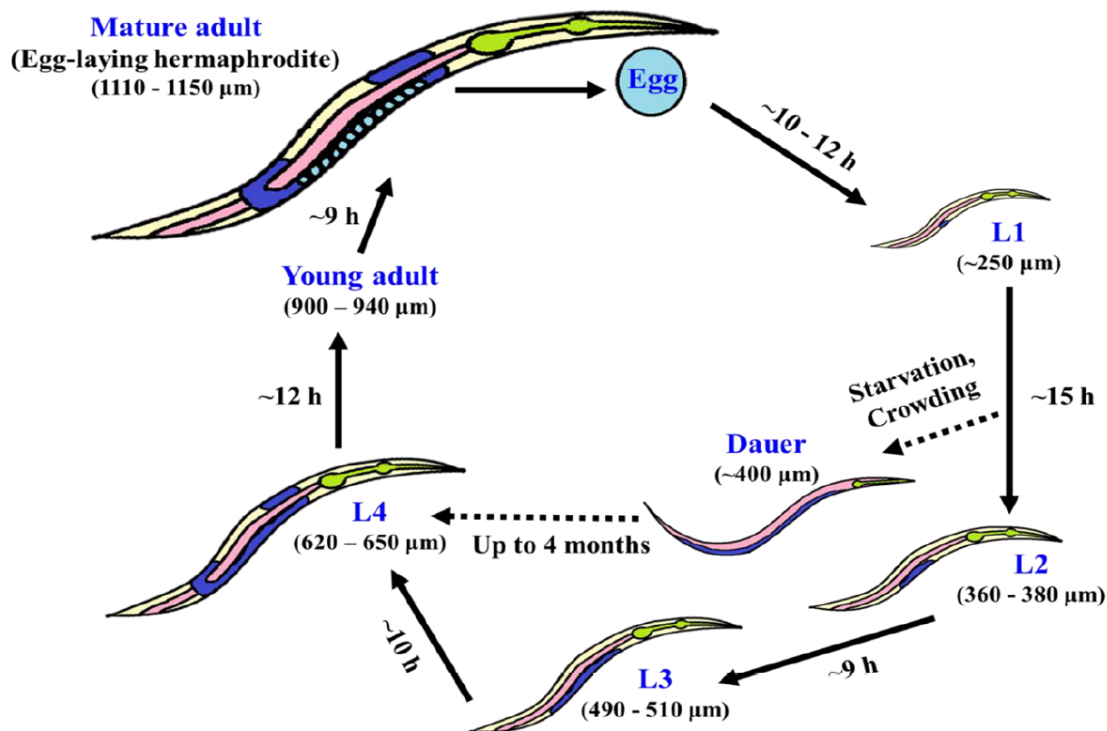


Figura 1. Ciclo de vida de *C. elegans* hermafrodita a 20 °C. O ciclo de vida reprodutivo da hermafrodita inclui 4 estágios larvais (L1 a L4). A larva *Dauer* é um estágio de diapausa, representando um estágio L3 alternativo, que é introduzido quando ocorrem condições desfavoráveis, como aglomeração ou baixa disponibilidade de alimentos.

Fonte: LIAO, 2018.

Após a eclosão do embrião, *C. elegans* passa por quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) até chegar à fase adulta (Figura 1). No final de cada estágio acontece um período de inatividade (*lethargus*), onde ocorre a produção de uma nova cutícula (BAUGH; HU, 2020).

Em condições desfavoráveis (poucos nutrientes, mudança de temperatura ou alta densidade populacional), *C. elegans* no estágio L1 pode sinalizar uma etapa de desenvolvimento alternativo, alcançando uma forma de resistência, denominada *Dauer* (permanente), que pode sobreviver durante meses em ambientes desfavoráveis. Nesse estágio, a cutícula contorna as aberturas bucal e anal, impedindo-o de se alimentar e continuar o seu desenvolvimento. Quando as condições ao nematoide são reestabelecidas, a larva *Dauer* realiza a muda, retorna a ser capaz de alimentar-se e continua o seu desenvolvimento como larva L4 até a forma adulta (CORSI et al., 2015).

2.3 Peptídeos, polipeptídeos e proteínas bioativas contra nematoides

Peptídeos são polímeros curtos de aminoácidos ligados por ligações peptídicas. Polipeptídeos são polímeros de aminoácidos maiores, com massas moleculares abaixo de

10.000 Da, e as proteínas têm massas moleculares mais elevadas (LEHNINGER et al., 2014).

Dentre inúmeras funções que estas moléculas podem desempenhar, pode-se citar sua função como parte do sistema de defesa vegetal contra fitopatógenos (HARRIS et al., 2014; AGUIRRE et al., 2018). Seu uso como ferramenta alternativa para o controle de infecções causadas por nematoides vem sendo estudado recentemente. Sabe-se, por exemplo, que protease, inibidor de protease, peptidase, quitinase entre outras proteínas apresentam atividade contra *H. contortus* (SOARES et al., 2015; SOARES et al., 2018).

Proteínas liberadas nos exsudatos de sementes de soja (*Glycine max*), incluindo β -1,3-glucanase, quitinase, lectinas, inibidor de tripsina e lipoxigenase (todas relacionadas à defesa das plantas), possuem propriedades nematocidas contra *Meloidogyne incógnita*, (ROCHA et al., 2015). Além disso, polipeptídeos cíclicos extraídos de plantas *Oldenlandia affinis* apresentam atividade anti-esquistossomótica *in vitro* e *in vivo* (MALAGÓN, 2013). Peptídeos cíclicos sintetizados foram avaliados quanto à atividade anti-helmíntica contra espécies do gênero *Eudrilus*, *H. contortus* e *T. colubriformis* (COLGRAVE et al., 2008; SHARMA et al., 2018).

Outro exemplo são os peptídeos Kalata, isolados de uma planta medicinal *Oldenlandia affinis* (GRAN et al., 2000). Dentre essa classe de peptídeos está o Kalata B2, que é um ciclotídeo pertencente à subfamília *Mobius* de ciclotídeos. Este peptídeo atua interagindo com as membranas celulares do organismo-alvo (PLAN et al., 2007; CRANFIELD et al., 2017). Em específico, os ciclotídeos se ligam e rompem as membranas que contêm fosfolipídios de fosfatidiletanolamina (BURMAN et al., 2011).

Assim, o uso terapêutico de peptídeos, polipeptídeos e proteínas é promissor, devido a vantagens comerciais, que incluem, risco reduzido de efeitos colaterais e alta biodisponibilidade (OLIVEIRA, 2017; SOARES et al., 2019).

2.4 *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth

Mimosa caesalpiniiifolia Benth, pertencente à família Leguminosae, subfamília Mimosoideae, conhecida popularmente como “sabiá” ou “sansão-do-campo”, é uma planta proveniente da caatinga do Nordeste do Brasil (Figura 2). É uma espécie que, além de proporcionar madeira para aplicações como estacas, moirões, lenha e carvão, exibe características ornamentais. Considerada uma planta pioneira e de acelerado crescimento, é bastante usada em plantios heterogêneos na recuperação de lugares degradados (LACERDA et al., 2006; MENDES et al., 2005; ABREU et al., 2019).

Classificada como árvore de pequeno porte, chegando a uma altura de 7 a 8 metros, essa espécie se distingue como uma das principais geradoras de estacas para cercas no Nordeste. As folhas, secas ou verdes, assim como as vagens, são forrageiras. Sua folhagem é vista como uma valiosa fonte de alimento para grandes e pequenos ruminantes, especialmente em períodos secos. As folhas dispõem de alto valor nutricional, integrando aproximadamente 17% de proteína. As flores são melíferas e a casca tem sido utilizada em medicina caseira (RIBASKI et al., 2003; SILVA, 2016).

É utilizada na popularmente em tratamentos de doenças respiratórias crônicas, circulatórias e em processos inflamatórios (LORENZI et al., 2006; BEZERRA et al., 2009). Além disso, algumas atividades biológicas já foram expostas dessa espécie cientificamente. O extrato etanólico das folhas apresentou atividade antimicrobiana considerável e ação inibitória mínima da aderência *in vitro* sobre as linhagens de *Streptococcus mitis* e *Streptococcus mutans* (LIMA, 2018).

Piña-Rodrigues e Lopes (2001) avaliaram o potencial de extratos aquosos dessa planta sobre a germinação de *Tabebuia serratifolia* (ipê-amarelo), comprovando que o extrato inibiu o processo germinativo. Em análises de Gonçalves et al. (2010), mostraram 0,45% de teor de cinzas e 11% de taninos na madeira de *M. caesalpiniiifolia*. Além disso, na medicina popular essa espécie é utilizada para tratar tosse e gastrite (AGUIAR; BARROS, 2012).

O extrato etanólico das folhas é uma intensa fonte de flavonoides, nomeadamente catequina e apresenta atividade citotóxica contra a linha celular de câncer da mama humano MCF-7 (SILVA et al., 2014). O extrato cetônico das folhas inibiu o desembainhamento larval e eclodibilidade de ovos de *H. contortus* (BRITO et al., 2018).

Recentemente foi verificado que proteínas presentes nos exsudatos de *M. caesalpiniiifolia* obtidos em pH 5,0 por 24 h, a 10 °C, inibem o desembainhamento de larvas de *Haemonchus contortus* (LICÁ et al., 2021). Neste estudo, que foi de alta importância pelo seu ineditismo, não se teve como objetivo avaliar a ação de exsudatos obtidos em temperatura mais próxima à ambiental (25 °C) e obter frações proteicas/polipeptídicas ativas contra o nematoide com consequente análise de seu possível mecanismo de ação. Assim, os exsudatos de sementes de *M. caesalpiniiifolia* possuem proteínas/polipeptídeos a serem estudados com maior profundidade, visando o desenvolvimento de um produto anti-helmíntico.



Figura 2. Exemplares de sementes da espécie *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Estudar proteínas/polipeptídeos com ação nematicida, de exsudatos de sementes de *Mimosa caesalpiniiifolia*

3.2 Objetivos específicos

Obter uma fração rica em polipeptídeos do exsudato das sementes de *M. caesalpiniiifolia*, bioativa contra *C. elegans*.

Avaliar a ação da fração polipeptídica sobre a ultraestrutura e propriedades mecânicas da cutícula de *C. elegans*.

Analisar o efeito citotóxico da fração polipeptídica bioativa sobre eritrócitos bovinos.

4 Material e métodos

Os principais estágios desenvolvidos neste estudo foram representados esquematicamente no fluxograma a seguir (Figura 3).

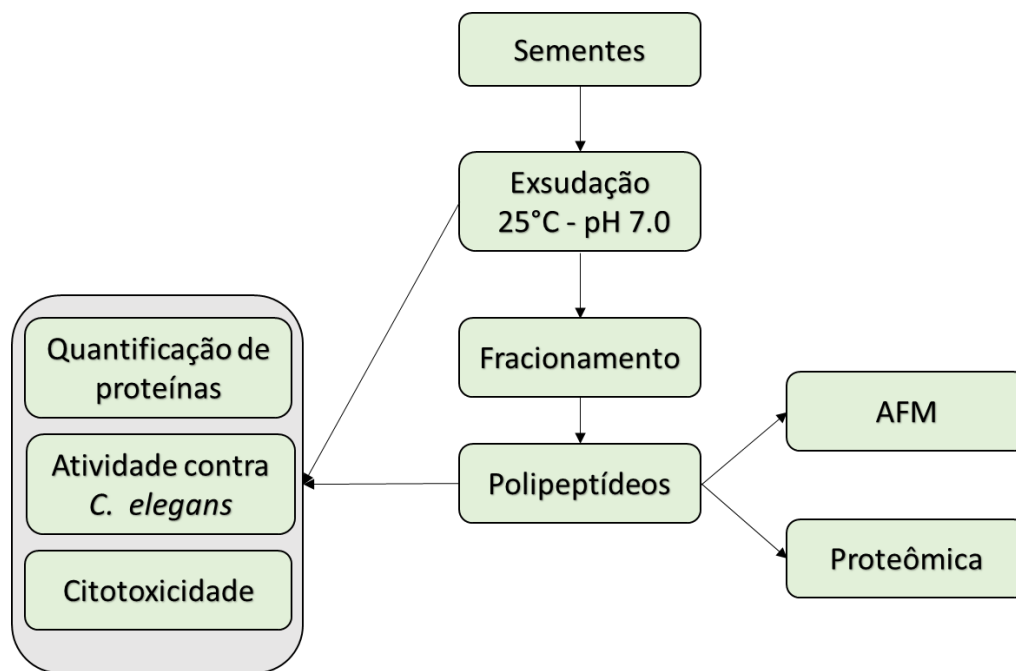


Figura 3. Fluxograma representando as principais etapas da metodologia.

4.1 Material biológico

4.1.1 Material vegetal

Sementes maduras de *Mimosa caesalpiniiifolia*, livres de tratamentos químicos ou físicos, foram adquiridas comercialmente na Arbocenter (Birigui, São Paulo, Brasil).

4.1.2 Cepa e cultura de *Caenorhabditis elegans*

A cultura e os ensaios anti-helmínticos contra *C. elegans* foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Katiki et al. (2011). A cepa N2 (tipo selvagem), adquirida do Laboratório de Controle de Parasitos do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (UFMA), foi criada em Nematode Growth Medium (NGM). Resumidamente, *C. elegans* foi mantido em placa de Petri com (NGM) semeado com 50 µL de uma suspensão a 1% (p / p) de *E. coli* (cepa NA22) de meio Luria Bertani-LB (10 g Bacto-triptona, 5 g Bactoyeast, 5 g NaCl, H₂O para 1000 mL, pH 7.0 usando 1 M NaOH) (BRENNER et al., 1974; STIERNAGLE et al., 2006). Os nematoides foram identificados como adultos (L5), adultos jovens (estágio L4 juvenil) e estágios larvais juvenis L1-L3 com base em seu tamanho e na presença e extensão do desenvolvimento vulvar (WOOD, 1988).

Para selecionar apenas adultos jovens e adultos, os nematoides *C. elegans* provenientes de quatro placas de culturas NGM de 4-7 dias de idade foram transferidos para um tubo de 50 ml e o volume foi completado com tampão M9 pH 7.0 (3 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 5 g NaCl, 1 M MgSO₄ 1 mL, e H₂O 1000 mL). Este tubo, que continha nematoides em todos os estágios do ciclo de vida, foi colocado em um suporte por 3 min para permitir o assentamento dos maiores nematoides.

Nematoides foram separados de acordo com seu tamanho por meio de duas peneiras. Primeiro usou-se uma peneira estéril de 32 µm para reter os maiores nematoides e permitir que nematoides menores migrassem pela peneira. Essa estratégia permitia reter os maiores nematoides, enquanto os menores passavam pela peneira. Aproximadamente 10 ml de tampão M9 foram usados para facilitar a migração. Nematoides retidos na peneira de 32 µm foram transferidos com 20 ml de tampão M9 em uma malha de peneira maior 53 µm. Neste procedimento todos os nematoides ativos (adultos e adultos jovens) passaram pela malha e todos mortos ou nematoides inativos foram retidos pela peneira de 53 µm.

4.2 Coleta de exsudatos de sementes de *M. caesalpiniiifolia* (McSEX) e preparação das frações proteicas

Sementes saudáveis de *M. caesalpiniiifolia* foram tratadas com etanol 70% (v / v) por 5 min, enxaguadas três vezes com água destilada e secas ao ar em temperatura ambiente (LICÁ et al., 2021). Para a coleta dos exsudatos, 32 grupos de sementes íntegras, (3,125 g por grupo), foram transferidos para frascos de tubo fálcon de 50 mL. Cada tubo, continha 12,0 mL de tampão fosfato de sódio 64 mM, pH 7.0, contendo NaCl 85,6 mM e 1 mM MgSO₄ (solução tampão denominada M9). Após 24 h a 25 °C, os exsudatos de sementes de *M. caesalpiniiifolia* (McSEX) foram coletados e os volumes registrados.

As proteínas, polipeptídeos e peptídeos presentes em McSEX foram precipitados pela adição gradual de sulfato de amônio até atingir 90% de saturação (SCOPES, 1994), sob banho de gelo e agitação contínua. Em seguida, a suspensão foi deixada em repouso por 4 h a 10 °C e então centrifugada (15.000 $\times$ g, 4 °C, 30 min). O sedimento resultante foi ressuspenso em tampão M9 e a suspensão foi dialisada (cut off 2 kDa) por 24 h contra o mesmo tampão, a 10 °C, com três trocas de tampão. Com o intuito de aumentar a abundância de proteínas/polipeptídeos termoestáveis, a fração foi então aquecida a 80 °C em banho-maria por 15 min e centrifugada a 15.000 $\times$ g por 10 min, a 4 °C (SANTOS et al., 2017). Após centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e denominado McSEX_{90%}.

Por meio de tubos contendo membranas de ultrafiltração (UF) com cut off de 30 kDa, usando um sistema de filtração de fluxo tangencial (TFF), o McSEX_{90%} foi centrifugado a 5.548 $\times$ g por 2 h a 4 °C. A solução que atravessou a membrana (moléculas com massa molecular menor que 30 kDa) foi novamente centrifugada usando tubos com membranas de UF com cut off de 10 kDa. Então, a solução que não passou por esta membrana foi denominada McF.30-10 (fração proteica com massa molecular aproximada entre 30 e 10 kDa). A solução que passou através da membrana (cut off 10 kDa) foi dialisada (membrana de diálise com cut off 2 kDa) por 24 h contra M9 (com três trocas) a 10 °C e a fração retida nesta última membrana de diálise, foi então denominada Mc.PEP (fração de polipeptídeos com massa molecular aproximada entre 10 e 2 kDa).

O teor de proteínas solúveis de McSEX, McSEX_{90%}, McF.30-10 e Mc.PEP foi determinado de acordo com o método de Bradford, usando albumina de soro bovino (BSA) como a proteína padrão (BRADFORD, 1976).

4.3 Análise de *Mc*.PEP por espectrometria de massa (MS)

Foi realizada uma nanocromatografia de fase reversa, acoplada com espectrometria de massa de alta resolução (nanoeletrospray), para identificação de polipeptídeos após digestão com tripsina de *Mc*.PEP (220 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (ARAÚJO et al., 2017). Os perfis de massa dos polipeptídeo foram analisados usando o software Peaks Studio X (Bioinformatics Solutions Inc.) usando banco de dados Fabales, tolerância inferior a 0,02 Da; carbamidometilação de resíduos de cisteína e oxidação de metionina foram definidas como modificações. Polipeptídeos com score $\geq 90\%$, foram selecionados.

4.4 Ensaios anti-helmínticos contra *Caenorhabditis elegans*

A motilidade de *C. elegans* foi avaliada em placas de cultura de 96 poços. Cada poço continha 200 μL de volume final, sendo 100 μL de tampão M9 com aproximadamente 100 nematoides (jovens e nematoides adultos com cutícula intacta), e 100 μL das amostras, em concentrações que variam de 163.75, 81.87, 40.93, 20.46, 10.23, 5.11, 2.55, 1,27 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Nos controles, 100 μL de M9 foram adicionados em vez das amostras. As placas de cultura de 96 poços foram incubadas, por 24h, em estufa incubadora tipo BOD regulada a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, UR $\geq 80\%$ (KATIKI et al., 2011). Em seguida, os nematoides móveis e não móveis foram observados por 5s usando um microscópio invertido (Zeiss Lab A1, AXIO). Os nematoides foram considerados vivos quando apresentavam algum tipo de motilidade. Nematoides mortos eram aqueles que não apresentavam movimentos da cauda, da cabeça ou da faringe. A fração com maior eficiência sobre *C. elegans* foi então selecionada para continuidade dos estudos.

4.5 Influência de *Mc*.PEP sobre a estrutura da cutícula de *Caenorhabditis elegans*

Para avaliar a estrutura da cutícula de *C. elegans* após tratamento com *Mc*.PEP, foram realizadas microscopia óptica e microscopia de força atômica (AFM). Foram montadas lâminas de vidro com nematoides adultos tratados por 24 h com *Mc*.PEP a 1,34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (em tampão M9) para avaliação por microscopia ótica. Para avaliações por microscopia de força atômica, nematoides adultos foram tratados por 24 h com a mesma concentração de *Mc*.PEP, fixados em formalina a 5% por 24 h e transferidos para lâminas.

4.5.1 Análise por microscopia óptica

As medidas de comprimento e volume do nematoide foram tomadas para avaliar possíveis alterações nestes parâmetros quando *C. elegans* foi exposto a *Mc.PEP*. Para isso, foram utilizados 51 adultos, sendo 24 nematoides controle e 27 nematoides tratados com *Mc.PEP*. As imagens, tiradas com um microscópio óptico (Zeiss Lab A1, AXIO; lente objetiva 10 × / 1.0), foram processadas e analisadas usando o software de código aberto ImageJ / Fiji (SCHINDELIN et al., 2012), com o plug-in WormSizer para detectar o tamanho do nematoide e forma (em micrômetros), onde o volume corporal total (em picolitros) foi usado como uma medida do tamanho corporal (MOORE et al., 2013).

4.5.2 Análise por microscopia de força atômica

A ação de *Mc.PEP* sobre a cutícula de *C. elegans* também foi avaliada por microscopia de força atômica. As medições de AFM foram realizadas usando um microscópio Multimode 8 (Bruker, Santa Barbara, CA) no modo PeakForce Tapping Quantitative Nanomechanics, no ar (temperatura de 23 °C e 44% de umidade do ar), para aquisição de dados de topografia, adesão, rugosidade e rigidez. Foram utilizadas sondas feitas de silicone, com constante de mola nominal de 0,4 N / m e com raio de ponta de aproximadamente 2 nm. As imagens foram obtidas aproximadamente na região central de adultos de *C. elegans*, com tamanho de varredura de 5 x 5 µm e curvas de força de 256 x 256. Os valores da rugosidade quadrada média (Rq) foram obtidos a partir dos mapas de altura, de acordo com a metodologia utilizada em Costa-Júnior et al. (2020). Os dados de adesão e rigidez foram obtidos a partir de 65.536 curvas de força produzidas na cutícula do nematoide, em seguida, as amostras de controle e tratadas com *Mc.PEP* foram comparadas. Para o cálculo da adesão, foram avaliados os valores máximos de deflexão negativa para cada curva de força. Para os dados de rigidez, os valores foram obtidos a partir da inclinação da curva de força na porção de contato da amostra.

4.6 Ensaio de hemólise

O ensaio de hemólise foi realizado *in vitro* com *Mc.PEP*, medindo-se a lise de eritrócitos bovinos de acordo com metodologia previamente descrita (OLIVEIRA et al., 2019), com pequenas modificações. O sangue total bovino (3 mL) foi coletado da veia jugular de bezerros em frasco de vidro contendo heparina (5 UI mL⁻¹) como anticoagulante, e em seguida foi lavado três vezes com NaCl 0,15 M. Os glóbulos

vermelhos (RBC) foram recuperados por centrifugação (centrifugação Mikro 200R, Hettich, Germany) a 300 x g, 5 min, 4 °C, e ressuspensos em 0,15 M de NaCl.

Para realizar este ensaio, o *Mc*.PEP foi dialisado (membrana de diálise - corte de 2 kDa) por 24 h contra PBS, pH 7.2 (tampão de fosfato de Na 0,05 M contendo NaCl 0,15 M) a 10 °C e as proteínas foram quantificadas novamente.

Alíquotas (100 µL) de uma suspensão de RBC 2,5% foram transferidas para microtubos (1,5 mL) e incubadas por 30 min a 37 °C com 100 µL de *Mc*.PEP a 45, 22.5, 11.25, 5.63, 2.81 e 1.41 µg mL⁻¹, seguido por centrifugação a 300 x g, 5 min, 4 °C. O sobrenadante (100 µL) foi coletado e transferido para poços de fundo plano de placas de cultura de 96 poços e hemólise (%) calculada pela medição da absorbância a 450 nm usando um leitor de microplacas automatizado (Epoch, BioTek Instruments Inc., EUA). A hemólise negativa (0%) e positiva (100%) foi obtida por tratamento de RBC com PBS e 0,1% (v / v) Triton X-100, respectivamente, em vez de *Mc*.PEP. A hemólise foi calculada usando a seguinte equação:
$$\frac{[(\text{Abs}_{450 \text{ nm de RBC tratado com } Mc.PEP} - \text{Abs}_{450 \text{ nm de RBC tratado com PBS})]}{[(\text{Abs}_{450 \text{ nm de RBC tratado com } 0,1\% \text{ Triton X-100}} - \text{Abs}_{450 \text{ nm de RBC tratado com PBS})]}] \times 100.$$

4.7 Análise estatística

Os dados do teor de proteína foram comparados por ANOVA seguida do teste de Tukey (P <0.05). A concentração inibitória (IC₅₀) de amostras contra nematoides foi calculada usando GraphPad Prism 8.0 (San Diego, CA, EUA). Os dados de adultos de *C. elegans* observados em AFM e FIJI / IMAGEJ, foram analisados usando D'Agostino & Pearson para normalidade (D'AGOSTINO; BELANGER, 1990), e as médias foram comparadas usando o teste de Kolmogorov-Smirnov (P <0.05).

5 Resultados

5.1 Determinação do teor de proteína de exsudatos e frações de sementes

O teor de proteínas solúveis de *McSEX*, *McSEX*_{90%}, *McF.30-10* e *Mc.PEP* foi 2,34, 0,33, 0,00109 e 0,000765 mgP g⁻¹ de semente (miligrama de proteína por grama de semente madura), respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Teor de proteínas dos exsudatos de sementes de *Mimosa caesalpinifolia* (*McSEX*) e as frações *McSEX*_{90%}, *McF.30-10* e *Mc.PEP*, expresso em miligramas de proteínas por grama de semente madura (mgP g⁻¹ semente).

Amostra*	Teor proteico (mgP g ⁻¹ semente)
<i>McSEX</i>	2,34 ^a ± 0,17
<i>McSEX</i> _{90%}	0,33 ^b ± 0,01
<i>McF.30-10</i>	0,00109 ^c ± 0,00
<i>Mc.PEP</i>	0,000765 ^c ± 0,00

**McSEX* (Exsudato de Semente); *McSEX*_{90%} (Fração de proteínas obtida de *McSEX* após precipitação com sulfato de amônio); *McF.30-10* (Fração composta por proteínas com massa molecular entre 30 e 10 kDa, obtida de *McSEX*_{90%}). *Mc.PEP* (Fração de polipeptídeos com massa molecular entre 10 e 2 kDa, obtida de *McSEX*_{90%}). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de dois experimentos independentes, feitos em três réplicas cada. Letras sobrescritas distintas na coluna representam diferenças significativas (teste de Tukey, p < 0.05).

5.2 Avaliação da motilidade em *Caenorhabditis elegans*

McSEX e as frações *McSEX*_{90%}, *McF.30-10* e *Mc.PEP* inibiram a motilidade de *C. elegans* (Tabela 2). *Mc.PEP* apresentou maior eficácia, inibindo a motilidade de *C. elegans* com uma IC₅₀ de 1,34 µg mL⁻¹ (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito de *McSEX*, *McSEX*_{90%}, *McF.30-10* e *Mc.PEP* sobre a motilidade de *C. elegans*.

Amostras	IC ₅₀ * ± DP (µgP mL ⁻¹)	95 % CL	Hillslope ± DP
<i>McSEX</i>	15,18 ± 6,27 ^b	12,32 – 18,73	0,72 ± 0,16
<i>McSEX</i> _{90%}	12,59 ± 7,39 ^b	9,97 – 16,06	0,48 ± 0,05
<i>McF.30-10</i>	9,74 ± 4,74 ^b	7,94 – 12,05	0,48 ± 0,00
<i>Mc.PEP</i>	1,34 ± 0,92 ^a	0,96 – 1,81	0,41 ± 0,10

* IC₅₀ denota a concentração de proteína que inibiu em 50% a população de nematoides móveis testados. Os valores representam as médias ± desvio padrão (DP) de três experimentos independentes. 95% CL significa a média dos limites de confiança inferior e superior a 95% de probabilidade.

5.3 Propriedades ultraestruturais e nanomecânicas de *Caenorhabditis elegans* tratado com Mc.PEP

As análises por microscopia óptica revelaram que não houve diferença significativa ($p < 0.05$) no comprimento ($970,7 \pm 376,8 \mu\text{m}$) e volume ($3487 \pm 4733 \text{ pL}$) de *C. elegans* após incubação com Mc.PEP ($1,34 \mu\text{g mL}^{-1}$), em comparação com os parâmetros correspondentes medidos nos controles realizados com tampão ($798,7 \pm 208,2$ e $970,7 \pm 376,8 \mu\text{m}$, respectivamente) (Figura 4A e 4B).

No entanto, a morfologia ultraestrutural e as propriedades biomecânicas do nematoide foram alteradas, conforme revelado pelos dados de AFM. A Figura 4C (controle) e 4D (tratada), em combinação com seus respectivos mapas tridimensionais (Figura 4E e 4F), revelaram uma diminuição significativa ($p < 0.05$) na altura da cutícula em *C. elegans* adulto ($571 \pm 185,9 \text{ nm}$) incubados com Mc.PEP ($1,34 \mu\text{g mL}^{-1}$), em comparação com os nematoides controles ($734,5 \pm 244,7 \text{ nm}$). Além disso, as imagens mostraram valores de rugosidade quadrada média (Rq) de $39,7 \text{ nm}$ para os nematoides tratados com Mc.PEP e $68,9 \text{ nm}$ para os controles. Essa diferença significativa ($p < 0.05$) denota uma diminuição na rugosidade da superfície dos animais tratados com Mc.PEP.

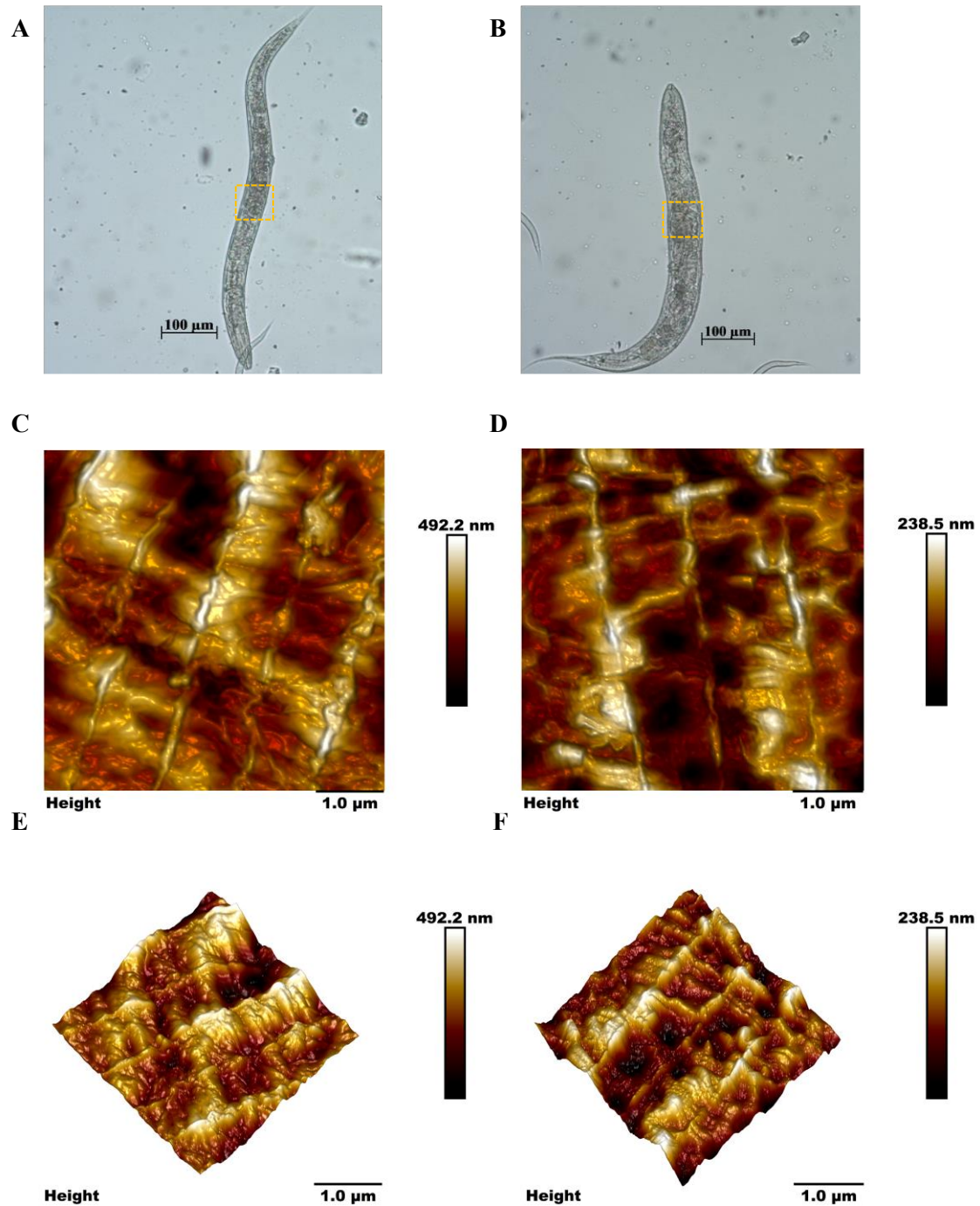


Figura 4. Estrutura da cutícula de *Caenorhabditis elegans*. A) Imagem óptica de *C. elegans* após tratamento tampão M9 (controle). B) *C. elegans* tratado com *Mc.PEP* ($1,34 \mu\text{g mL}^{-1}$). Ampliação total: 100 x. Os quadrados amarelos nas imagens A e B indicam a região da cutícula onde as imagens foram obtidas para microscopia de força atômica (AFM). C) Imagens de *C. elegans* após tratamento com controle (tampão M9) e D) *Mc.PEP* ($1,34 \mu\text{g mL}^{-1}$); e seus respectivos mapas tridimensionais (E e F).

Os resultados obtidos por AFM também revelaram diferenças nas propriedades biomecânicas dos nematoides tratados com *Mc*.PEP em relação aos controles (Figura 5). O *Mc*.PEP promoveu uma diminuição na rigidez da cutícula do nematoide de $11,11 \pm 0,863$ N / m no controle para $8,586 \pm 0,558$ N / m no teste com *Mc*.PEP ($p < 0.05$). A adesão da superfície da cutícula aumentou de $5,029 \pm 1,499$ nN no controle para $6,693 \pm 3,537$ nN no teste após tratamento de *C. elegans* com *Mc*.PEP (Figura 5A e 5B).

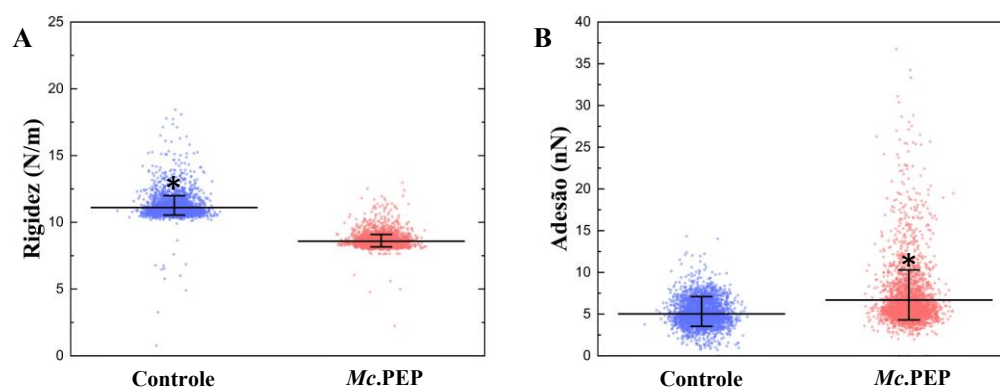


Figura 5. Dados de rigidez (A) e adesão (B) da cutícula de *Caenorhabditis elegans* adulto incubado com o tampão M9 (controle) e com *Mc*.PEP ($1,34 \mu\text{g mL}^{-1}$). * Denota diferença significativa ($p < 0.05$).

5.4 Análise proteômica de *Mc*.PEP

Após análise dos dados de espectrometria de massa de *Mc*.PEP, 69 polipeptídeos foram identificados (Tabela 3).

Tabela 3. Polipeptídeos identificados em *Mc.PEP* por LC-ESI-MS / MS.

ID	Sequência	Comprimento	Hidrofobicidade	Carga Líquida	Peso molecular (Da)
Pep1	KEVELEDPVENIGAK	15	-0,22	-3	1670,07
Pep2	VAKEVELEDPVENIGAK	17	-0,15	-3	1840,31
Pep3	ASVAKTFLMSDCVVVEIK	18	0,03	0	1940,6
Pep4	GVTVAKEVELEDPVENIGAK	20	-0,1	-3	2097,65
Pep5	EGGREAEGLSLDESK	16	-0,34	-4	1705,98
Pep6	KTMVVGDEELEAGAGSR	17	-0,18	-2	1749,17
Pep7	LTAKDLGDVANR	12	-0,24	0	1272,59
Pep8	SAAGYAANKATELASK	16	-0,12	1	1552,91
Pep9	ALDEDVVELR	10	-0,2	-3	1158,41
Pep10	DDENDFTNHHPR	12	-0,52	-2	1496,63
Pep11	EEDGVVLEAGSRQ	13	-0,24	-3	1388,64
Pep12	SGQTFNDVGRVGDEGTLR	18	-0,26	-1	1908,28
Pep13	TFNDVGRVGDEGTLR	15	-0,26	-1	1635,97
Pep14	VSGDLAQKPVAPQ	13	-0,1	0	1309,67
Pep15	DLTSGRLPVDN	11	-0,24	-1	1186,44
Pep16	EAEGLSLDESK	12	-0,28	-4	1306,51
Pep17	EVEAKEAAFEVSGKE	15	-0,22	-3	1580,87
Pep18	NDEGHRGSSDLNDSGKGDDNR	21	-0,51	-2,5	2245,47
Pep19	VEVEESRPGAV	11	-0,17	-2	1171,42
Pep20	LAAKDLEDANR	11	-0,34	-1	1215,47
Pep21	DDVGRVGDEGTLRVQ	15	-0,3	-2	1615,94
Pep22	DVGRVGDEGTLRVQ	14	-0,27	-1	1500,84
Pep23	KSLTHPSDVVEETR	14	-0,33	-0,5	1597,94
Pep24	NDVGRVGDEGTLRVQ	15	-0,3	-1	1614,96
Pep25	VGDEELEAGSR	11	-0,27	-3	1161,34
Pep26	ALDDAGDLLGDVKER	15	-0,23	-3	1586,93
Pep27	DDFLSEQGDATLNPR	15	-0,29	-3	1677,95
Pep28	DVTLDKAAQAKDVTLGK	18	-0,18	0	1830,33
Pep29	EGLASNVLTNR	11	-0,14	0	1156,46
Pep30	ETVVPGGTGGKS	12	-0,06	0	1088,36
Pep31	HDDENDFTNHHPR	13	-0,51	-1,5	1633,79
Pep32	LVDKDNVVDNR	11	-0,3	-1	1229,51
Pep33	VVGDEELEAGSRQ	13	-0,24	-3	1388,64
Pep34	AHHDDENDFTNPR	13	-0,46	-2	1567,72
Pep35	EGGKSFEGSGEEVEKL	16	-0,22	-3	1682,01
Pep36	FDDVGRVGDEGTLR	14	-0,27	-2	1535,83
Pep37	FEEVKKDGESGREER	15	-0,56	-2	1795,1
Pep38	MTVGDEEVLEAGAGSR	16	-0,12	-3	1620,98
Pep39	MTVVGDEELEASGR	14	-0,17	-3	1492,82
Pep40	NPAEKELATERKE	13	-0,48	-1	1514,83
Pep41	PSNDDLVSVDLRNK	14	-0,34	-1	1571,9
Pep42	RVVKDQSFEGSGEEVEK	17	-0,34	-2	1923,31
Pep43	VGDEELEAGSRQ	12	-0,3	-3	1289,49
Pep44	AGVHDLDDVYR	11	-0,21	-1,5	1259,49
Pep45	EAREEEGLSLDESK	14	-0,41	-4	1591,84

Tabela 3. Polipeptídeos identificados de *Mc.PEP* por LC-ESI-MS / MS. (Continuação)

ID	Sequência	Comprimento	Hidrofobicidade	Carga Líquida	Peso molecular (Da)
Pep46	ESQTFRAWTKVSQ	13	-0,31	1	1567,9
Pep47	HHDDENDFTNPR	12	-0,52	-2	1496,63
Pep48	HHSPSTGDRDL	13	-0,37	-1	1433,63
Pep49	KAAQAKDVTLDK	12	-0,32	1	1287,64
Pep50	QSEEEVDPELK	11	-0,39	-4	1302,51
Pep51	VGDEGTLRQV	10	-0,2	-1	1073,32
Pep52	VTGTVGQDLQSKAHDVK	17	-0,2	0,5	1783,23
Pep53	DEHGGGPVHLA	11	-0,04	-1	1088,31
Pep54	EAGQFKEDRAEAAK	15	-0,35	-1	1620,93
Pep55	EEGELSLDESKFKTR	15	-0,4	-2	1768,12
Pep56	EVSGPLKPGVD	11	-0,08	-1	1097,39
Pep57	HHDDENDFTNPRH	13	-0,51	-1,5	1633,79
Pep58	LLPSNDDVSDVLVVS	16	0,04	-3	1685,14
Pep59	QAGAAQGVKEKAQGAGGR	18	-0,23	2	1684,11
Pep60	SFGGSAEELELK	12	-0,1	-2	1266,54
Pep61	DPRLPDHP	10	-0,41	-1,5	1158,36
Pep62	EGLSSNVLTRDP	12	-0,23	-1	1287,56
Pep63	HDSVDEPGDDADAALR	16	-0,3	-4,5	1682,88
Pep64	LFVDKDGNNVDYR	13	-0,21	-1	1539,89
Pep65	LTAKDLGDVNR	11	-0,28	0	1201,5
Pep66	MGAHHDDENDFTNPR	15	-0,37	-2	1756
Pep67	QAGAAQVGKEKAAGAGANR	19	-0,19	2	1755,19
Pep68	RVGDEGTLRVQ	11	-0,35	0	1229,52
Pep69	YVDDVDVVR	10	-0,12	-2	1178,44

5.5 Avaliação da atividade citotóxica por células de mamíferos

Mc.PEP causou hemólise baixa de eritrócitos bovinos, havendo apenas 1,8% de hemólise a $45 \mu\text{g mL}^{-1}$ de *Mc.PEP* (Figura 6).

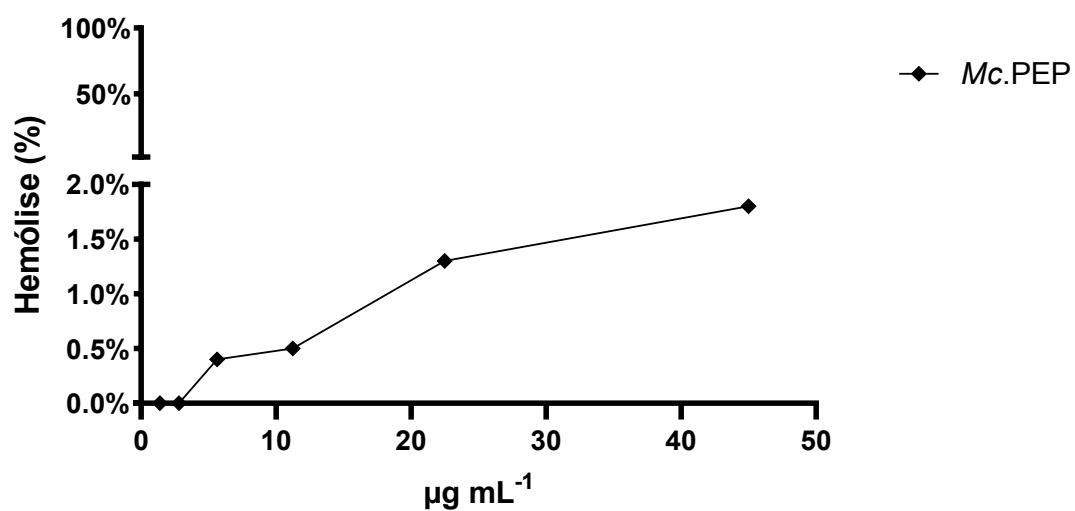


Figura 6. Atividade hemolítica de *Mc.PEP* na concentração de $45 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra eritrócitos bovinos.

6 Discussão

Durante a evolução, as plantas foram submetidas a uma variação de fatores abióticos e/ou bióticos, que podem em certas circunstâncias, ser prejudiciais ao crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas (DEMIREVSKA et al., 2010; NADEEM et al., 2014). Os exsudatos das sementes representam uma fonte útil de moléculas de defesa, como proteínas e metabólitos secundários com capacidade de inibir patógenos (ROCHA et al., 2015; YANG et al., 2016). Proteínas, assim como polipeptídeos e peptídeos podem ter efeito inibitório contra organismos específicos (RIBEIRO et al., 2021; SCARAFONI et al., 2013).

O exsudato das sementes (*McSEX*) neste estudo apresentou teor proteico de 2,34 miligramas de proteína por grama de sementes (mgP g^{-1} sementes) (Tabela 1). O teor proteico dos exsudatos das sementes é variável em diferentes condições. Por exemplo, o exsudato das sementes de *Myracrodruon urundeuva* obtidos em pH 5,0, a 5 °C, apresentou teor proteico de 0,24 microgramas de proteína por miligrama de sementes ($0,24 \mu\text{gP mg}^{-1}$ semente) (SOARES et al., 2018). O exsudato de sementes de *Moringa oleífera* obtido em água a 28 °C por 24 h, apresentou $0,57 \text{ mgP g}^{-1}$ semente (SOUSA et al., 2020). Vale ressaltar que diferentes estudos usam diferentes estratégias de obtenção do exsudato, como por exemplo o uso ou não uso de diálise e o uso de diferentes *cut off* de membranas, o que interfere no teor proteico final.

Neste estudo, o exsudato de sementes maduras de *M. caesalpinifolia* obtido a 25 °C passou por processos de fracionamento com sulfato de amônio e diálise e a fração proteica resultante (*McSEX*_{90%}) apresentou $0,33 \text{ mgP g}^{-1}$ sementes (Tabela 1). Conteúdo proteico maior ($0,49 \text{ mgP g}^{-1}$ semente) foi obtido da fração proteica do exsudato das sementes de *M. caesalpinifolia*, a 10 °C (LICÁ et al., 2021). Essa diferença se deve possivelmente a diferentes condições de exsudação e ao tratamento térmico do exsudato em nosso estudo para retirada de proteínas termolábeis.

A utilização de *C. elegans* como modelo experimental para testes anti-helmínticos de produtos vegetais é de grande importância para o desenvolvimento de novos produtos. A inibição da motilidade dos nematoides experimentalmente observada pode ser consequência de alguns efeitos deletérios que esses produtos exerceram sobre o animal, que poderiam, eventualmente, influenciar a sobrevivência (WEEKS et al., 2018). Várias proteínas exsudadas de sementes, como proteases, quitinases e lectinas podem interferir com os mecanismos fisiológicos do nematoide (SOARES et al., 2018; SOUSA et al., 2020; SOARES et al., 2015; SALLES et al., 2014; SOARES et al., 2019). Neste estudo,

os exsudatos e as frações constituintes de sementes maduras de *M. caesalpiniiifolia* apresentaram potencial anti-helmíntico (Tabela 2), pois suas concentrações para inibir a motilidade de 50% de *C. elegans* adulto, são menores que aquelas relatadas por outros estudos (SOARES et al 2018; ARAÚJO et al., 2017; WANDERLEY et al., 2018).

A atividade anti-helmíntica de proteínas/polipeptídeos vegetais vem sendo bem documentada, destacando a importância dessas moléculas como potenciais agentes de combate aos nematoides. Por exemplo, os polipeptídeos (peso molecular entre 2500 e 4000 Da) extraídos das folhas de *Oldenlandia affinis* apresentaram atividade contra *Schistosoma* (MALAGON et al., 2013). Além disso, as proteínas bioativas exsudadas por sementes de *M. caesalpiniiifolia* inibiram o desenvolvimento larval de *H. contortus* (LICÁ et al., 2021).

Para verificar se *Mc.PEP* alteraria a motilidade do nematoide induzindo modificações na cutícula, o AFM se mostrou uma abordagem valiosa. *Mc.PEP* mudou notavelmente a ultraestrutura e as propriedades nanomecânicas da cutícula de *C. elegans* (Figuras 4 e 5). A superfície da cutícula é especialmente importante para a interação parasito-hospedeiro. Por exemplo, quando o nematoide parasito *H. contortus* entra em contato com o tecido do hospedeiro, mudanças nos lipídios em sua superfície podem estabelecer o início do processo de infecção (MENDOZA et al., 2000; PROUDFOOT et al., 1993).

Este é o primeiro estudo relatando a redução da altura e rugosidade da cutícula de *C. elegans* por polipeptídeos (Figura 4D e 4F). A cutícula de *C. elegans* consiste principalmente de glicoproteínas depositadas em uma camada lipídica, que está sobre uma espessa matriz de colágeno (PAGE; JOHNSTONE, 2007). Foi demonstrado que peptídeos kalata B1 e kalata B6 interagem com membranas lipídicas (KAMIMORI et al., 2005), mas raros são os estudos com peptídeos sobre nematoides e seus mecanismos de ação, sendo assim necessários mais estudos para elucidar a interação dos polipeptídeos exsudados de *M. caesalpiniiifolia* com a cutícula do nematoide, bem como a importância da redução da altura e da rugosidade no mecanismo de ação dessas moléculas.

Como pode ser visto na Figura 5, a técnica de AFM nos permite detectar diferenças em nano escala na rigidez e adesão da cutícula de *C. elegans*, após o tratamento com *Mc.PEP*. A rigidez diminuiu após o tratamento com *Mc.PEP*. Redução similar da dureza e desgaste da cutícula são observados durante o processo de senescência da cutícula de *C. elegans* (ESSMANN et al., 2020). Como os nematoides controle e tratados com *Mc.PEP* foram analisados no mesmo estágio do ciclo de vida, as alterações

observadas estão relacionadas à interação da cutícula do nematoide com os polipeptídeos. Observou-se ainda forças de adesão aumentadas na cutícula de *C. elegans* após o tratamento com *Mc*.PEP, o que representa uma alteração na cutícula devido à interação com *Mc*.PEP.

É importante notar que as forças de adesão são uma combinação das forças eletrostática, van der Waals e capilar promovidas pelas ligações químicas (BUTT et al., 2005). Principalmente nos casos de sondas não funcionalizadas (como feito nesta pesquisa), as forças de adesão são tidas como interações inespecíficas e não é possível separar a contribuição de cada uma dessas forças. No entanto, como as sondas utilizadas nas análises de AFM foram feitas do mesmo material (Si) e os experimentos e observações foram realizados nas mesmas condições (temperatura e umidade do ar), diferenças nas forças de adesão entre os controles e nematoides tratados com *Mc*.PEP são plausíveis. Os gráficos de dispersão (Figura 5B) mostram valores que sugerem uma tendência de aumento da força de adesão após o tratamento com *Mc*.PEP de *C. elegans*. Conforme relatado por Essmann et al. (2020), em seus resultados do módulo de Young da cutícula de *C. elegans* ao longo de um período de 18 dias, a direção de espalhamento sugere a tendência dos eventos cinéticos.

É sugerido que haja duas formas nas quais uma droga anti-helmíntica pode acessar os tecidos alvos do nematoide: por ingestão ou difusão através da cutícula. Para muitas drogas, a cutícula é uma barreira para a permeabilidade (HOLDEN-DYE et al., 2014). Como *Mc*.PEP causa danos à cutícula do nematoide, seu uso como sinérgico junto a drogas anti-helmínticas comercializadas pode ser considerado.

Para tratar a infecção de nematoides por via oral com qualquer medicamento, deve-se estar ciente dos possíveis efeitos colaterais que podem causar no hospedeiro. De fato, *Mc*.PEP causou hemólise muito baixa de células sanguíneas bovinas, mesmo em concentrações mais altas do que os valores de IC₅₀ necessários para cessar a motilidade de *C. elegans* (Figura 6). Assim, a presença de proteínas e polipeptídeos bioativos nos exsudatos de sementes de *M. caesalpiniiifolia* oferece futuras direções para pesquisas com o objetivo de avançar no desenvolvimento de produtos a partir de exsudatos de sementes para o controle de nematoides.

7 Conclusão e perspectivas

Os resultados aqui apresentados indicam que as proteínas e polipeptídeos dos exsudatos de sementes maduras de *M. caesalpiniiifolia* causam efeitos nocivos contra o nematoide *C. elegans* e, portanto, poderiam controlar importantes nematoides parasitos.

Referências bibliográficas

- ABONGWA M, MARTIN RJ, ROBERTSON AP. A brief review on the mode of action of antinematodal drugs. *Acta Veterinaria-Beograd*, 67(2): 137-152; 2017.
- ABREU M, MENDES FILHO P, GARCIA K, JUNIOR J, DA G, ALBUQUERQUE S, ARAUJO J, L. TAVELLA L. Effect of Manganese on Growth and Nodulation of *Mimosa caesalpiniaefolia* (Benth.), *Journal of Agricultural Science*, 11(2): 339-352; 2019.
- AGUIAR LCGG, BARROS RFM. Medicinal plants cultivated in homegardens of rural communities in the domain of Cerrado in Piauí (Demerval Lobão Municipality, Piauí State, Brazil). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 14(3): 419-434; 2012.
- AGUIRRE SA, MEZA-ESPINOZA L, HERNÁNDEZ-MENDOZA A, VALLEJO-CÓRDOBA B, GONZÁLEZ-CÓRDOVA AF, MONTALVO-GONZÁLEZ E. Evaluación de la capacidad de inhibición de hemólisis oxidativa y actividad antimicrobiana de fracciones peptídicas obtenidas de la hidrólisis de proteínas de huevo, leche y soya usando proteasas extraídas de *Bromelia pinguin* y *Bromelia karatas*. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21(1): 13-21; 2018.
- AMLIWALA K, BULL K, WILLSON J, HARDER A, HOLDEN-DYE L, WALKER RJJD. Emodepside, a cyclo-octadepsipeptide anthelmintic with a novel mode of action, *Drugs Future*, 29(1): 1015-1024; 2004.
- ANTOSHECHKIN, I. STERNBERG, PW. The versatile worm: genetic and genomic resources for *Caenorhabditis elegans* research. *Nat. Rev. Genet*, 8: 518–532; 2007.
- ARAÚJO SA, SOARES AMS, SILVA CR, ALMEIDA JUNIOR EB, ROCHA CQ, FERREIRA A, PERALES J, COSTA-JUNIOR LM. *In vitro* anthelmintic effects of *Spigelia anthelmia* protein fractions against *Haemonchus contortus*, *PLoS One*, 12(12): 1-11, 2017.
- BACELAR PAA, SANTOS JPD, MONTEIRO KJL, CALEGAR D. A, NASCIMENTO EFD, CARVALHO-COSTA FA. Parasitoses intestinais e fatores associados no estado do Piauí: uma revisão integrativa. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, 10(4): 1802-1809; 2018.
- BARDA BD, KEISER J, ALBONICO M. Human Trichuriasis: Diagnostics Update. *Current Tropical Medicine Reports*, 2(4): 201-208; 2015.
- BARTSCH SM, HOTEZ PJ, ASTI L, ZAPF KM, BOTTAZZI ME, DIEMERT DJ, LEE DYJ. The global economic and health burden of human hookworm infection, *PLoS neglected tropical diseases*, 10(9): 1-17; 2016.
- BAUGH LR, HU PJ. Starvation Responses Throughout the *Caenorhabditis elegans* Life Cycle. *Genetics*, 216(4): 837-878; 2020.
- BENVEGNÚ E, VIEIRA MIB, RODRIGUEZ R, HERMES CC, PORTO S. Manutenção Do Ciclo Biológico Do Nematóide *Angiostrongylus costaricensis*. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, 9(12): 1-3; 2018.

BESIER R, KAHN L, SARGISON N, VAN WYK JJAIP. The pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants, *Advances in parasitology*, 93(1): 95-143; 2016.

BEZERRA DAC, PEREIRA AV, LOBO K, RODRIGUES OG, ATHAYDE AC, MOTA RA, RODRIGUES SC. Atividade biológica da juremapreta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(4): 814-817; 2009.

BLAXTER MJPB. Nematodes: the worm and its relatives, *PLoS Biol*, 9(4): 1-9; 2011.

BRADFORD MMJAB. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72(1-2): 248-254; 1976.

BRENNER SJG, The genetics of *Caenorhabditis elegans*, *Genetics*, 77(1): 71-94, 1974.

BRITO DRB, COSTA-JÚNIOR LM, GARCIA JL, TORRES-ACOSTA JFJ, LOUVANDINI H, CUTRIM-JÚNIOR JAA, SOARES EDS. Supplementation with dry *Mimosa caesalpiniiifolia* leaves can reduce the *Haemonchus contortus* worm burden of goats. *Veterinary parasitology*, 252: 47-51; 2018.

BULL K, COOK A, HOPPER NA, HARDER A, HOLDEN-DYE L, WALKER RJJJFP, Effects of the novel anthelmintic emodepside on the locomotion, egg-laying behaviour and development of *Caenorhabditis elegans*, *International journal for parasitology*, 37(6): 627-636; 2007.

BURMAN, R., STRÖMSTEDT, A. A., MALMSTEN, M., GÖRANSSON, U. Cyclotide–membrane interactions: Defining factors of membrane binding, depletion and disruption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1808(11), 2665-2673, 2011.

BUTT HJ, CAPPELLA B, KAPPL MJSSR, Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications, *Surface science reports*, 59(1-6): 1-152;2005.

CHEONG, MC, WANG, Z., JALETA, TG, LI, X., LOK, JB, KLIEWER, SA, MANGELSDORF, DJ. Identification of a nuclear receptor/coactivator developmental signaling pathway in the nematode parasite *Strongyloides stercoralis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 118, n. 8, 2021.

COLGRAVE ML, HUANG Y-H, CRAIK DJ, KOTZE ACJAA, chemotherapy, Cyclotide interactions with the nematode external surface, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(5): 2160-2166; 2010.

COLGRAVE ML, KOTZE AC, IRELAND DC, WANG CK, CRAIK DJ. The anthelmintic activity of the cyclotides: natural variants with enhanced activity, *Chembiochem*, 9(12): 1939-1945; 2008.

CORSI AK, WIGHTMAN B, CHALFIE MJG, A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*, 200(2): 387-407; 2015.

CORSI AK. A biochemist's guide to *C. elegans*. Annal Biochem, 359(1):1-17; 2006.

COSTA-JUNIOR LM, SILVA CR, SOARES AMS, MENEZES AS, SILVA MR, AMARANTE AF, COSTA EF, ALENCAR LMJU. Assessment of biophysical properties of *Haemonchus contortus* from different life cycle stages with atomic force microscopy, Ultramicroscopy, 209(1): 1-21; 2020.

CRANFIELD CG, HENRIQUES ST, MARTINAC B, DUCKWORTH P, CRAIK DJ, CORNELL, B. Kalata b1 and kalata b2 have a surfactant-like activity in phosphatidylethanolamine-containing lipid membranes. Langmuir, v. 33, n. 26, p. 6630-6637, 2017.

D'AGOSTINO RB, BELANGER A, D'AGOSTINO JR RBJTAS. A suggestion for using powerful and informative tests of normality, The American Statistician, 44(4): 316-321;1990.

DENT JA, DAVIS MW, AVERY L. Avr-15 encodes a chloride channel subunit that mediates inhibitory glutamatergic neurotransmission and ivermectin sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. The EMBO J, 16(19): 5867–5879; 1997.

DUDLOVÁ A, JURIŠ P, JURIŠOVÁ S, JARČUŠKA P, KRČMÉRY VJH. Epidemiology and geographical distribution of gastrointestinal parasitic infection in humans in Slovakia. Helminthologia, 53(4): 309-317; 2016.

ESSMANN CL, ELMI M, SHAW M, ANAND GM, PAWAR VM, SRINIVASAN MAJNN, Biology, Medicine, *In-vivo* high resolution AFM topographic imaging of *Caenorhabditis elegans* reveals previously unreported surface structures of cuticle mutants, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 13(1): 183-189; 2017.

ESSMANN CL, MARTINEZ-MARTINEZ D, PRYOR R, LEUNG KY, KRISHNAN KB, LUI PP, N.D.E. GREENE NDE, BROWN AEX, VM PAWAR, SRINIVASAN MA, CABREIRO F, Mechanical properties measured by atomic force microscopy define health biomarkers in ageing *C. elegans*, Nat Commun, 11(1):1-16; 2020.

FEASEY N, WANSBROUGH-JONES M, MABEY DC, SOLOMON AW. Neglected tropical diseases. British medical bulletin, 93(1): 179-200; 2010.

FÉLIX MA, BRAENDLE C. The natural history of *Caenorhabditis elegans*. Current Biology, 20(22): 965-969; 2010.

FENALTI JM, SANTOS TM, SANTOS PC, BACCEGA BB, SCAINI CJ. Diversidade das plantas brasileiras com potencial anti-helmíntico. Revista de Ciências da Saúde, 28(1): 38-49; 2016.

FIGUEIREDO LA, REBOUCAS TF, FERREIRA SR, RODRIGUES-LUIZ GF, MIRANDA RC, ARAUJO RN, FUJIWARA RT. Dominance of P-glycoprotein 12 in

phenotypic resistance conversion against ivermectin in *Caenorhabditis elegans*, PLoS One 13(2): 1-14; 2018.

FLAMMER PG, RYAN H, PRESTON SG, WARREN S, PŘICHYSTALOVÁ R, WEISS R, PALMOWSKI V, BOSCHERT S, FELLGIEBEL K, JASCH-BOLEY IJPNTD. Epidemiological insights from a large-scale investigation of intestinal helminths in Medieval Europe, PLoS neglected tropical diseases, 14(8): 1-20; 2020.

FUKUYAMA Y, IWAMOTO S, TANAKA KJJOMS. Rapid sequencing and disulfide mapping of peptides containing disulfide bonds by using 1, 5-diaminonaphthalene as a reductive matrix, Journal of mass spectrometry, 41(2): 191-201; 2006.

GARCÍA-GONZÁLEZ AP, WALHOUT AJ. *Caenorhabditis elegans* as a model for host-microbe-drug interactions. Current Opinion in Systems Biology, 6(1): 46-50; 2017.

GILDING EK, JACKSON MA, POTH AG, HENRIQUES ST, PRENTIS PJ, MAHATMANTO T, CRAIK DJJNP. Gene coevolution and regulation lock cyclic plant defence peptides to their targets, New Phytologist, 210(2):717-730; 2016.

GILLAN V, MAITLAND K, LAING R, GU H, MARKS ND, WINTER AD, BARTLEY D, MORRISON A, SKUCE PJ, REZANSOFF AM, GILLEARD JS, MARTINELLI A, BRITTON C, DEVANEY E. Increased Expression of a MicroRNA Correlates with Anthelmintic Resistance in Parasitic Nematodes, Front Cell Infect Microbiol, 7(1) 1-15; 2017.

GILLEARD JS. Understanding anthelmintic resistance: the need for genomics and genetics. International journal for parasitology, 36 (12): 1227-1239, 2006.

GILPIN W, UPPALURI S, BRANGWYNNE CP. Worms under pressure: bulk mechanical properties of *C. elegans* are independent of the cuticle, Biophysical journal, 108(8): 1887-1898; 2015.

GONÇALVES CA, LELIS RCC, ABREU HS. Caracterização físico-química da madeira de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth). Revista Caatinga, 23(1): 54-62; 2010.

GRAN L, SANDBERG F, SLETTEN K. *Oldenlandia affinis* (R&S) DC: a plant containing uteroactive peptides used in African traditional medicine. Journal of ethnopharmacology, 70(3): 197-203; 2000.

GUEST M, BULL K, WALKER RJ, AMLIWALA K, O'CONNOR V, HARDER A, HOLDEN-DYE L, HOPPER NAJJFP. The calcium-activated potassium channel, SLO-1, is required for the action of the novel cyclo-octadepsipeptide anthelmintic, emodepside, in *Caenorhabditis elegans*, International journal for parasitology, 37(14): 1577-1588; 2007.

HAHNEL SR, DILKS CM, HEISLER I, ANDERSEN EC, KULKE DJJFPD, RESISTANCE D. *Caenorhabditis elegans* in anthelmintic research—Old model, new perspectives. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, 14: 237-248; 2020.

- HAHNEL SR, DILKS CM, HEISLER I, ANDERSEN EC, KULKE DJJFPD. *Caenorhabditis elegans* in anthelmintic research—Old model, new perspectives, *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 14(1): 237-248; 2020.
- HARRIS PW, YANG SH, MOLINAA, LÓPEZ G, MIDDLEDITCH M, BRIMBLE MA. Plant Antimicrobial Peptides Snakin-1 and Snakin-2: Chemical Synthesis and Insights into the Disulfide Connectivity. *Chemistry—A European Journal*, 20(17): 5102-5110;
- HERNANDEZ-LEDESMA B, HSIEH CC. Chemopreventive role of food-derived proteins and peptides: A review, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 57(11): 2358-2376; 2017.
- HERRERA AM, MELLO ACL, OLIVEIRA APOLINÁRIO VX, JÚNIOR JCBD, CUNHA MV, SANTOS MVF. Potential of *Gliricidia sepium* (jacq.) Kunth ex Walp. and *Mimosa caesalpinifolia* Benth. in silvopastoral systems intercropped with signalgrass [*Urochloa decumbens* (Stapf) RD Webster]. *Agroforestry Systems*, 95(1): 1-12; 2021.
- HESHOF R, VISSCHER B, PRÖMEL S, HUGHES SJB. Large-scale cultivation of *Caenorhabditis elegans* in a bioreactor using a labor-friendly fed-batch approach, *BioTechniques*, 67(1): 33-39, 2019.
- HOLDEN-DYE L, WALKER RJWTOROCB, Anthelmintic drugs and nematocides: studies in *Caenorhabditis elegans*, *WormBook: the online review of C. elegans biology*, 1: 1-29; 2014.
- HUANG Y-H, COLGRAVE ML, DALY NL, KELESHIAN A, MARTINAC B, CRAIK DJJJOBC, The biological activity of the prototypic cyclotide kalata b1 is modulated by the formation of multimeric pores, *Journal of Biological Chemistry*, 284(31): 20699-20707; 2009.
- JABBAR, A., IQBAL, Z., KERBOEUF, D., MUHAMMAD, G., KHAN, M. N., AFAQ, M. Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life sciences*, v. 79, n. 26, p. 2413-2431, 2006.
- JACKSON F, VARADY M, BARTLEY DJ. Managing anthelmintic resistance in goats—Can we learn lessons from sheep?. *Small Ruminant Research*, 103(1): 3-9; 2012.
- KALETTA T, HENGARTNER MO. Finding function in novel targets: *Caenorhabditis elegans* as a model organism. *Nature reviews Drug Discovery*, 5(5): 387-399; 2006.
- KAMIMORI H, HALL K, CRAIK DJ, AGUILAR MIJAB, Studies on the membrane interactions of the cyclotides kalata B1 and kalata B6 on model membrane systems by surface plasmon resonance, *Analytical biochemistry*, 337(1): 149-153; 2005.
- KATIKI LM, FERREIRA JF, ZAJAC AM, MASLER C, LINDSAY DS, CHAGAS ACS, AMARANTE AFJVP. *Caenorhabditis elegans* as a model to screen plant extracts and compounds as natural anthelmintics for veterinary use, *Veterinary Parasitology*, 182(2-4): 264-268; 2011.

KONG C, ENG SA, LIM MP, NATHAN S. Beyond traditional antimicrobials: A *Caenorhabditis elegans* model for discovery of novel anti-infectives. *Frontiers in microbiology*, 7: 1-14; 2016.

LACERDA MRB, PASSOS MA, RODRIGUES JJV, BARRETO LP. Características físicas e químicas de substratos à base de pó de coco e resíduo de sisal para produção de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth). *Revista Árvore*, 30(2): 163-170; 2006.

LANOUE A, BURLAT V, HENKES GJ, KOCH I, SCHURR U, ROSE US. De novo biosynthesis of defense root exudates in response to *Fusarium* attack in barley, *New Phytol*, 185(2): 577-588; 2010.

LEHNINGER TM, NELSON DL, COX MM. Princípios de Bioquímica. 6ª Edição, ed. Artmed, 2014.

LIAO VHC. Use of *Caenorhabditis elegans* to study the potential bioactivity of natural compounds, *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(8): 1737-1742; 2018.

LICÁ ICL, SOARES AMS, FERREIRA ATS, PERALES J, CUNHA IAL, COSTA-JÚNIOR LMJVP. *In vitro* assessment of the efficacy of protein exudates from seeds against *Haemonchus contortus*, *Veterinary Parasitology*, 292(1): 1-5; 2021.

LICÁ ICL, SOARES AMS, MESQUITA LSS, MALIK SJFRI. Biological properties and pharmacological potential of plant exudates, *Food Research International*, 105(1): 1039-1053; 2018.

LIMA FHS, DAMASCENO GS, PIRES LLS, COSTA JG, ROCHA TJM, SANTOS AF. Atividade antibacteriana e antiaderente do extrato de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth sobre micro-organismos do biofilme dentário. *Diversitas Journal*, 3(2): 395-401; 2018.

LIMA, MED. *Caenorhabditis elegans*: um modelo experimental para a análise dos efeitos agudos de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e uma ferramenta para a potencialização do Ensino de Ciências na Escola Básica. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Pampa, Uruguai, Rio Grande do Sul, 2013.

LIU M, PANDA SK, LUYTEN W. Plant-based natural products for the discovery and development of novel anthelmintics against nematodes. *Biomolecules*, 10(3): 1-22; 2020.

LIU Q, COBB JS, JOHNSON JL, WANG Q, AGAR JNJJOCS. Performance Comparisons of Nano-LC Systems, Electrospray Sources and LC-MS-MS Platforms, *Journal of chromatographic science*, 52(2): 120-127; 2014.

LORENZI H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Platarum, 1: 351; 2006.

MALAGÓN D, BOTTERILL B, GRAY DJ, LOVAS E, DUKE M, GRAY C, JONES MK. Anthelmintic activity of the cyclotides (kalata B1 and B2) against schistosome parasites. *Peptide Science*, 100(5):461-70, 2013.

- MALAGON D, BOTTERILL B, GRAY DJ, LOVAS E, DUKE M, GRAY C, KOPP SR, KNOTT LM, D.P. MCMANUS DP, DALY NL, MULVENNA J, CRAIK DJ, JONES MK, Anthelmintic activity of the cyclotides (kalata B1 and B2) against schistosome parasites, *Biopolymers*, 100(5): 461-70; 2013.
- MENDES SS, SANTOS PR, SANTANA GDC, RIBEIRO GT, MESQUITA JB. Levantamento, patogenicidade e transmissão de fungos associados às sementes de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth). *Revista Ciência Agronômica*, 36(1): 1-6; 2005.
- MENDOZA ML, MODHA J, ROBERTS M, CURTIS R, KUSEL JJP. Changes in the lipophilicity of the surfaces of *Meloidogyne incognita* and *Haemonchus contortus* during exposure to host signals. *Parasitology*, 120(2): 203-209; 2000.
- MESHGI B, JALOUSIAN F, FATHI S, JAHANI Z. Design and synthesis of a new peptide derived from *Fasciola gigantica* cathepsin L1 with potential application in serodiagnosis of fascioliasis. *Experimental parasitology*, 189: 76-86; 2018.
- MOORE BT, JORDAN JM, BAUGH LRJPO. WormSizer: high-throughput analysis of nematode size and shape, *PloS one*, 8(2): 1-13; 2013.
- MORAES J. Natural products with antischistosomal activity. *Future Medicinal Chemistry*, 7(6): 801-820; 2015.
- NARAYANI M, BABU R, CHADHA A, SRIVASTAVA SJPR. Production of bioactive cyclotides: A comprehensive overview. *Phytochemistry Reviews*, 19(1): 787-825; 2020.
- NAYAK S, GOREE J, SCHEDL T. Fog-2 and the evolution of self-fertile hermaphroditism in *Caenorhabditis*. *PLoS biology*, 3(1): 57-71; 2004.
- NIXON SA, SAEZ NJ, HERZIG V, KING GF, KOTZE ACJVP, The antitrypanosomal diarylamidines, diminazene and pentamidine, show anthelmintic activity against *Haemonchus contortus* *in vitro*, *Veterinary parasitology*, 270(1): 40-46; 2019.
- NÓBREGA F, SANTOS I, CUNHA MD, CARVALHO A, GOMES VJP. Antimicrobial proteins from cowpea root exudates: inhibitory activity against *Fusarium oxysporum* and purification of a chitinase-like protein, *Plant and Soil*, 272(1-2): 223-232; 2005.
- OLIVEIRA AFD. Bioprospecção de produtos vegetais do cerrado maranhense com atividade anti-helmíntica. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, 2017.
- OLIVEIRA GDDC. Prospeção de bioatividade de peptídeos e proteínas de baixo peso molecular extraídos das sementes de *Erythrina velutina* e *Amburana cearensis*. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.
- OLIVEIRA J, SOUZA FP, VASCONCELOS IM, DIAS LP, MARTINS TF, VAN TILBURG MF, SOUSA DO. Mo-CBP3-PepI, Mo-CBP3-PepII, and Mo-CBP3-PepIII are synthetic antimicrobial peptides active against human pathogens by stimulating ROS

OLIVEIRA JTA, SOUZA PFN, VASCONCELOS IM, DIAS LP, MARTINS TF, VAN TILBURG MF, GUEDES MIF, SOUSA DOB. Mo-CBP3-PepI, Mo-CBP3-PepII, and Mo-CBP3-PepIII are synthetic antimicrobial peptides active against human pathogens by stimulating ROS generation and increasing plasma membrane permeability, *Biochimie*, 157(1): 10-21; 2019.

ONG YC, ROY S, ANDREWS PC, GASSER GJCR. Metal compounds against neglected tropical diseases. *Chemical reviews*, 119(2): 730-796; 2018.

OSÓRIO TM, MELO MENEZES L, ROSA, KB, ESCOBAR RF, LENCINA RM, MELLO MAYDANA G, SOUZA V. Q. Resistência anti-helmíntica em nematódeos gastrointestinais na ovinocultura: uma revisão. *Brazilian Journal of Development*, 6(11): 89194-89205; 2020.

PAGE AP, JOHNSTONE IJW. The cuticle, *WormBook* 1(1): 1-16; 2007.

PARK S, STRÖMSTEDT AA, GÖRANSSON UJPO, Cyclotide structure–activity relationships: qualitative and quantitative approaches linking cytotoxic and anthelmintic activity to the clustering of physicochemical forces, *PloS one*, 9(3): 1-18; 2014.

PEÑA ZM, VAZQUEZ DMP, SÁNCHEZ MG, OLIVO LAS, TIPACAMÚ GA, CARBAJAL FA. El nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo para evaluar el potencial antihelmíntico de extractos de plantas. *Revista mexicana de ciencias pecuárias*, 8(3): 279-289; 2017.

PIÑA-RODRIGUES FCM, LOPES BM. Potencial alelopático de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (Cham.) Sandw. *Floresta e Ambiente*, 8: 130-136; 2001.

PLAN MRR, GÖRANSSON U, CLARK RJ, DALY NL, COLGRAVE ML, CRAIK DJ. The cyclotide fingerprint in *Oldenlandia affinis*: elucidation of chemically modified, linear and novel macrocyclic peptides. *ChemBioChem*, 8(9): 1001-1011; 2007.

PROUDFOOT L, KUSEL J, SMITH H, KENNEDY MJP. External stimuli and intracellular signalling in the modification of the nematode surface during transition to the mammalian host environment. *Parasitology*, 107(5): 559-566; 1993.

RIBASKI J, LIMA PCF, OLIVEIRA VR, DRUMOND MA. Sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia*) árvore de múltiplo uso no Brasil. *Embrapa Florestas-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)* 1: 1-4; 2003.

RIBEIRO HS, SOARES AMS, BRITO DJC, OLIVEIRA JTA, COSTA-JUNIOR LMJTJOP. Inhibition of Protease and Egg Hatching of *Haemonchus contortus* by Soybean Seed Exudates, *The Journal of Parasitology*, 107(1): 23-28; 2021.

ROCHA RO, MORAIS JK, OLIVEIRA JT, OLIVEIRA HD, SOUSA DO, SOUZA CE, MORENO FB, MONTEIRO-MOREIRA AC, SOUZA JUNIOR JD, SA MF, I.M. Proteome of Soybean Seed Exudates Contains Plant Defense-Related Proteins Active against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*, *J Agric Food Chem*, 63(22): 5335-5343; 2015.

SALINAS G, RISI GJP, *Caenorhabditis elegans*: nature and nurture gift to nematode parasitologists, *Parasitology*, 145(8): 979-987; 2018.

SALLES HO, BRAGA ACL, NASCIMENTO MTDSC, SOUSA AMP, LIMA AR, VIEIRA LDS, A.C.R. CAVALCANTE ACR, EGITO AS, ANDRADE LBDSJRBDPV, LECTIN. Hemolysin and protease inhibitors in seed fractions with ovicidal activity against *Haemonchus contortus*, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(2): 136-143; 2014.

SANTOS LDA, TAVEIRA GB, RIBEIRO SDF, SILVA PEREIRA L, OLIVEIRA CARVALHO A, RODRIGUES R, OLIVEIRA AEA, O.L.T. MACHADO, SILVA ARAÚJO J, VASCONCELOS JIMJS. Purification and characterization of peptides from *Capsicum annuum* fruits which are α -amylase inhibitors and exhibit high antimicrobial activity against fungi of agronomic importance, *Protein expression and purification*, 132(1): 97-107; 2017.

SCARAFONI A, RONCHI A, PRINSI B, ESPEN L, ASSANTE G, VENTURINI G, DURANTI MJTFJ. The proteome of exudates from germinating *Lupinus albus* seeds is secreted through a selective dual-step process and contains proteins involved in plant defence, *The FEBS Journal*, 280(6):1443-1459; 2013.

SCHINDELIN J, ARGANDA-CARRERAS I, FRISE E, KAYNIG V, LONGAIR M, PIETZSCH T, PREIBISCH S, RUEDEN C, SAALFELD S, SCHMID BJNM. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nature methods*, 9(7): 676-682; 2012.

SCOPE RK. Making an Extract. In: *Protein Purification*. Springer Advanced Texts in Chemistry, *Protein Purification*, 22-43; 1994.

SHARMA M, SINGHVI I, ALI ZM, KUMAR M, DEV SK. Synthesis and biological evaluation of natural cyclic peptide. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(2): 220-228; 2018.

SILVA MJD. Estudo fitoquímico e biológico dos extratos das folhas de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, São Paulo, 2016.

SIMPKIN KG, COLES GC. The use of *Caenorhabditis elegans* for anthelmintic screening. *J Chem Technol Biotechnol*, 31: 66-69; 1981.

SOARES AMDS, ARAÚJO SAD, LOPES SG, COSTA JUNIOR LM. Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* protein extracts on *Haemonchus contortus*, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24(4): 396-401; 2015.

SOARES AMDS, WANDERLEY LF, COSTA JUNIOR LM. The potential of plant and fungal proteins in the control of gastrointestinal nematodes from animals, *Rev Bras Parasitol Vet*, 28(3): 339-345; 2019.

SOARES AMDS, WANDERLEY LF, COSTA JUNIOR LM. The potential of plant and fungal proteins in the control of gastrointestinal nematodes from animals. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 28(3): 339-345; 2019.

SOARES AMS, OLIVEIRA JTA, ROCHA CQ, FERREIRA ATS, PERALES J, ZANATTA AC, VILEGAS W, SILVA CR, COSTA-JUNIOR LM. *Myracrodruon urundeuva* seed exudates proteome and anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*, *PLoS One*, 13(7): 1-12; 2018.

SOARES AMSS, ARAÚJO SAD, LOPES SG, COSTA JUNIOR LM. Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* protein extracts on *Haemonchus contortus*, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24(4): 396-401; 2015.

SOUSA AJS, SOUZA PFN, GIFONI JM, DIAS LP, FREITAS CDT, OLIVEIRA JTA, SOUSA DOB, VASCONCELOS IM, Scanning electron microscopy reveals deleterious effects of *Moringa oleifera* seed exuded proteins on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* eggs, *Int J Biol Macromol*, 154: 1237-1244; 2020.

SOUZA PF, LIMA PG, FREITAS CD, SOUSA DO, NETO NA, DIAS LP, VASCONCELOS IM, FREITAS LB, SILVA RG, SOUSA JSJM. Antidermatophytic Activity of Synthetic Peptides: Action mechanisms and clinical application as adjuvants to enhance the activity and decrease the toxicity of Griseofulvin, *Mycoses*, 63(9): 979-992; 2020.

STIERNAGLE T, WORMBOOK IKW. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, 1(1): 1551-8507; 2006.

TAVARES RC, MENDES FILHO PF, LACERDA CFD, SILVA JJRCA. Colonização micorrízica e nodulação radicular em mudas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) sob diferentes níveis de salinidade, *Revista Ciência Agronômica*, 43(3): 409-416; 2012.

TRITTEN L, BRAISSANT O, KEISER JJP. Comparison of novel and existing tools for studying drug sensitivity against the hookworm *Ancylostoma ceylanicum* *in vitro*, *Parasitology* 139(3): 348-357; 2012.

VALENTINE A, WEXLER A, YATES JJ. The US Global Health Budget: Analysis of the Fiscal Year 2017 Budget Request, Menlo Park: Kaiser Family Foundation, March 22(1): 1-10; 2016.

VLAS SJ, STOLK WA, RUTTE EA, HONTELEZ JA, BAKKER R, BLOK DJ, LUYENDIJK M. Concerted efforts to control or eliminate neglected tropical diseases: how much health will be gained?. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(2): 1-14; 2016.

WANDERLEY LF, SOARES AMDS, FIGUEIREDO IMD, FERREIRA ATDS, PERALES J, MOTA HRDO, OLIVEIRA JTA, COSTA JUNIOR LMJRBDPV, A cysteine protease from the latex of *Ficus benjamina* has in vitro anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 27(4): 473-480; 2018.

WEEKS JC, ROBERTS WM, LEASURE C, SUZUKI BM, ROBINSON KJ, CURREY H, WANGCHUK P, EICHENBERGER RM, SAXTON AD, BIRD TDJS. Sertraline, paroxetine, and chlorpromazine are rapidly acting anthelmintic drugs capable of clinical repurposing, Scientific reports 8(1): 1-17; 2018.

WOOD WB. The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Edited by WILLIAM B. WOOD and the Community of *C. elegans* Researchers. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 667 pages, Genetics Research 52(3); 243-244; 1988.

YANG G, ZHOU B, ZHANG X, ZHANG Z, WU Y, ZHANG Y, LÜ S, ZOU Q, GAO Y, TENG LJPO, Effects of tomato root exudates on *Meloidogyne incognita*, PLoS One 11(4): 1-16; 2016.