

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

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DO PEIXE *Hoplias malabaribus* COMO  
FONTE DE PROTEASES ATIVAS CONTRA O NEMATÓIDE *Haemonchus  
contortus***

**DANIELLA DE JESUS CASTRO BRITO**

São Luís, MA  
2019

DANIELLA DE JESUS CASTRO BRITO

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DO PEIXE *Hoplias malabaribus* COMO  
FONTE DE PROTEASES ATIVAS CONTRA O NEMATÓIDE *Haemonchus  
contortus***

Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Saúde e ambiente da UniversidadeFederal do Maranhão, como requisito para aobtenção do título de Mestre em Saúde e ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Martins  
dos Santos Soares

São Luís, MA

2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Brito, Daniella.

APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DO PEIXE *Hoplias malabaribus*  
COMO FONTE DE PROTEASES ATIVAS CONTRA O NEMATÓIDE  
*Haemonchus contortus* / Daniella Brito. - 2019.  
56 f.

Orientador(a): Alexandra Soares.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em  
Saúde e Ambiente/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,  
UFMA/ Laboratório de surfactantes, 2019.

1. Atividade nematicida. 2. Protease. 3. Resíduos de  
peixes. I. Soares, Alexandra. II. Título.

DANIELLA DE JESUS CASTRO BRITO

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DO PEIXE *Hoplias malabaribus* COMO  
FONTE DE PROTEASES ATIVAS CONTRA O NEMATÓIDE *Haemonchus  
contortus***

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

Aprovada em //

BANCA EXAMINADORA

---

**Prof.<sup>a</sup>. Dra. Alexandra Martins Dos Santos Soares**  
(Presidente)

---

**Dr. Leonardo Teixeira Dall Agnol**

---

**Dr.<sup>a</sup>. Talita da Silva Espósito**

---

**Dr.<sup>a</sup>. Livio Martins Costa Junior**

---

**Dr.<sup>a</sup> Ana Clécia Santos de Alcântara**

*Aos meus pais, Marieta Brito e João Brito,  
que por vezes abdicaram de seus sonhos  
para que eu realizasse os meus.*

“A sabedoria não se transmite, é preciso que nós a descubramos fazendo uma caminhada que ninguém pode fazer em nosso lugar e que ninguém nos pode evitar, porque a sabedoria é uma maneira de ver as coisas.”

*Marcel Proust*

## AGRADECIMENTOS

Meus profundos agradecimentos a todos que me apoiaram nesta caminhada. Minha família, meus amigos e toda equipe do laboratório de bioquímica vegetal. De forma muito especial a minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Alexandra Soares, que me acolheu e direcionou nesses dois anos.

Agradeço a Universidade Federal do Maranhão, ao programa de pós-graduação em saúde e ambiente, aos órgãos de fomento CNPq e FAPEMA. E aos laboratórios parceiros, Laboratório de controle de parasitos, na pessoa do Prof. Dr. Livio Martins Costa Junior e Laboratório Bioaqua, na pessoa da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Talita Espósito.

A todos muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	14
<b>2. Revisão bibliográfica</b> .....	16
2.1 Produção de caprinos e ovinos no Brasil.....	16
2.2 <i>Haemonchus contortus</i> .....	16
2.2.1 Aspectos gerais e significância econômica.....	16
2.2.2 Classificação e ciclo de vida.....	18
2.2.3 Ecologia e distribuição geográfica .....	19
2.2.4 Fisiopatologia e patogênese.....	20
2.2.5 Os anti-helmínticos e seus mecanismos de ação.....	21
2.2.6 Resistência anti-helmíntica do <i>H. contortus</i> .....	22
2.3 <i>Hoplias malabaricus</i> .....	23
2.4 Indústria pesqueira e seus subprodutos.....	25
2.5 Proteases .....	27
2.5.1 Geral.....	27
2.5.2 Protease de pescados.....	28
<b>3. Objetivos</b> .....	28
3.1 Geral.....	28
3.2 Específicos.....	28
<b>4. Materiais e métodos</b> .....	29
4.1 Obtenção dos exemplares.....	29
4.2 Preparo do extrato bruto.....	29
4.3 Obtenção de uma fração enriquecida em proteases.....	30
4.4 Quantificação de proteínas.....	30
4.5 Atividade proteolítica.....	30
4.6 Efeito de pH e temperatura na atividade da protease.....	30
4.7 Teste de eclodibilidade.....	31
4.8 Análise estatística.....	31
<b>5. Resultados e discussão</b> .....	32
5.1 Biometria dos espécimes de <i>Hoplias malabaricus</i> selecionados.....	32
5.2 Quantificação e atividade proteolítica.....	33
5.3 Testes de natureza físico-química.....	35
5.4 Eclodibilidade.....	37

<b>6. Considerações finais.....</b>	<b>40</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>41</b>

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

<b>ABS</b>	Absorbancia
<b>BSA</b>	Albumina Sérica Bovina, do inglês “Bovine Serum Albumin”
<b>BZs</b>	Benzimidazis
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EB</b>	Extrato Bruto
<b>FAO</b>	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, do inglês “Food and Agriculture Organization”
<b>FP</b>	Frao Proteolítica
<b>IC50</b>	Concentrao inibitria da eclodibilidade de 50% dos ovos
<b>IUBMB</b>	Unio Internacional de Bioqumica e Biologia Molecular “International Union of Biochemistry and Molecular Biology”
<b>KDa</b>	Kilo Dalton
<b>L1</b>	Larvas de primeiro estágio
<b>L2</b>	Larvas de segundo estágio
<b>L3</b>	Larvas de terceiro estágio
<b>L4</b>	Larvas de quarto estágio
<b>L5</b>	Larvas de quinto estágio
<b>MLs</b>	Lactonas macrocíclicas, do inglês “macrocyclic lactones”
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>TCA</b>	cido tricloroacético
<b>UAP</b>	Unidade de atividade proteolítica
<b>UR</b>	Umidade Relativa
<b>VT</b>	Volume de amostra utilizada no teste
<b>WAAVP</b>	Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária, do inglês “Association for the Advancement of Veterinary Parasitology”
<b>PPM</b>	Pesquisa Pecuária Municipal
<b>FAO</b>	Organização das Nações Unidas para a alimentação e a Agricultura, do inglês “Food and Agriculture Organization”
<b>GIN</b>	Nematóide gastrointestinal, do inglês “Gastrointestinal nematode

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Ciclo de vida do nematódeo gastrointestinal *Haemonchus contortus* representativo da família Trichostrongylidae. L: estágios larvais. Fonte: Embrapa, 2019.....18
- Figura 2.** Ilustração de espécime do peixe teleósteo *Hoplias malabaricus*. Fonte: J. F. Hennig.....24
- Figura 3.** Ceco pilórico de exemplar do peixe teleósteo *Hoplias malabaricus*.....26
- Figura 4.** Mapa da área de obtenção dos exemplares.....29
- Figura 5.** Exemplar do peixe *Hoplias malabaricus* coletado no município de Viana, Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil.....32
- Figura 6.** Teor de proteína e atividade proteolítica do extrato bruto e das frações proteolíticas das vísceras da espécie de peixe *Hoplias malabaricus*. (A) Teor de proteína total do extrato bruto (EB) e frações (F030; F3060; F6090) de *Hoplias malabaricus*, expresso como mgPT (miligrama de proteína total). (B) Atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato. Atividade expressa pela unidade de Atividade Proteolítica/Miligrama de Proteína (UAP/mgP).....34
- Figura 7.** Gráfico da análise físico-química. (A) Efeito do pH na atividade proteolítica da FP; (B) Efeito da temperatura na atividade proteolítica da FP. Utilizando azocaseína como substrato. Atividade expressa pela unidade de Atividade Proteolítica/ Miligrama de Proteína (UAP/mgP).....37
- Figura 8.** Gráfico do teste de inibição da eclodibilidade dos ovos de *Haemonchus contortus*. Sendo o produto inibidor a FP. Em concentrações de 29,71; 14,85; 7,42; 3,71; 1,85 µg/ml. Para controle usa-se o tampão de diluição das amostras (PBS).....38

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1-** Biometria dos espécimes de *Hoplias malabaricus*

**Tabela 2-** Rendimento de recuperação proteica

**Tabela 3-** Quadro de purificação parcial de proteases a partir dos cecos pilóricos de peixes da espécie *Hoplias malabaricus*.

## RESUMO

A criação de caprinos e ovinos é uma importante atividade econômica no Brasil, porém a infecção por nematóides gastrintestinais tornou-se um problema na produção desses pequenos ruminantes. O controle destes parasitos é realizado por meio dos anti-helmínticos disponíveis comercialmente, no entanto, o uso indiscriminado destes tem favorecido a seleção de cepas resistentes, além de causar impactos negativos ao ambiente, sendo iminente a busca por alternativas para o controle de nematóides. Os produtos naturais vem sendo considerados promissores para este fim. Os subprodutos da Indústria pesqueira são fontes importantes de biomoléculas, como as proteases, com potencial aplicação em processos biotecnológicos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito anti-helmíntico de proteases semi-purificada das vísceras de *Hoplias malabaricus* sobre *Haemonchus contortus*. Os peixes foram obtidos no município de Viana, Baixada Maranhense. Estes foram medidos, pesados e tiveram os cecos pilóricos removidos. Os cecos foram homogeneizados com solução Tris-HCl 0,01M, pH 8,0. O material resultante desse processo foi centrifugado e o sobrenadante obtido foi denominado extrato bruto (EB). O EB foi submetido a fracionamento por meio de precipitação com sulfato de amônio com intervalos de saturação de 0-30, 30-60 e 60-90%. Foram realizados os testes bioquímicos de determinação do teor protéico e atividade proteolítica do EB e frações. Caracterizou-se a fração com maior atividade proteolítica (FP) em relação a temperatura e pH. O Ensaio anti-helmíntico foi realizado por meio do teste de inibição da eclodibilidade dos ovos de *H. contortus*. EB, F030, F3060 e F6090 apresentaram 72,8; 5,9; 27,4; 25,6 miligramas de proteínas totais, respectivamente. A atividade proteolítica foi de 1095,8; 662,9; 1769,2 e 949,6 UAP/mgP para EB, F030, F3060 e F6090, respectivamente. A fração 30-60% foi denominada fração enriquecida com protease (FP). A FP apresenta melhor atividade proteolítica em pH 8 e temperatura 30°C. A FP apresentou eficiência inibição de eclodibilidade de ovos de *H. contortus* com IC 50 de 14,6 µg/mL. Concluiu-se que as proteases dos cecos pilóricos do peixe *Hoplias malabaricus* apresentam alta atividade anti-helmíntica contra o nematóide *H. contortus*, tornando-se uma molécula potencial para o desenvolvimento de nematicida.

**Palavras-chave:** Protease, resíduos de peixes, atividade nematicida.

## ABSTRACT

Goats and sheep farming is an important economic activity in Brazil, but gastrointestinal nematode infection became a problem in these small ruminants. The control of these parasites is done with anthelmintic substances commercially available, however, the indiscriminate use of these substances has helped the development of resistant strains, and also impact negatively the environment, being urgent the research of new alternatives for the nematode control. Natural products are being considered very promising for this purpose. The fish industry subproduct is an important biomolecules source, such as proteases with potential use in biotechnological processes. For that matter, the scope of this work was to evaluate the protease anthelmintic effect semi-purified of *Hoplias malabaricus* viscera over *Haemonchus contortus*. The fishes were obtained in Viana city, in the Baixada Maranhense. They were measured, heightened and had their pyloric caecum removed. The caecum was homogenized with Tris-HCl solution 0,01M, pH 8,0. The resultant material from this process was centrifuged and the supernatant obtained was named Crude Extract (EB). The EB was submitted to a fractioning through precipitation with ammonium sulfate with saturation intervals of 0-30, 30-60 and 60-90%. Biochemical tests were made for the proteic content determination and proteolytic activity of EB and fractions. The fraction with the highest proteolytic activity (PF) was characterized according to temperature and pH. The anthelmintic essay was done through the inhibition hatchability test of *H. contortus* eggs. BE, F030, F3060 and F6090 showed 72.8, 5.9, 27.4 and 25.6 milligrams of total proteins, respectively. The proteolytic activity was 1095.8, 662.9, 1769.2 and 949.6 UAP/mgP for the BE, F030, F3060 and F6090, respectively. The 30-60% fraction was named enriched fraction with protease (PF). The PF showed the inhibition efficiency of the hatchability of *H. contortus* eggs with IC 50 of 14.6 µg/mL. The proteases of the pyloric caecum of *Hoplias malabaricus* fish showed high anthelmintic activity over *H. contortus* nematode, being a potential molecule for the development of a nematicide.

**Keywords:** Protease, fish residue, nematicide.

## 1. Introdução

A produção de pequenos ruminantes é uma atividade econômica amplamente explorada em todo mundo. No Brasil (HERMUCHE et al., 2012; MARANHÃO, 2013), grande parte dos rebanhos está concentrada na região Nordeste, responsável por 66% do rebanho ovino e 93,9% do rebanho caprino (Embrapa, 2019). A infecção por nematoides gastrintestinais é um dos principais problemas na criação de pequenos ruminantes (CEZAR et al., 2008; IGARASHI et al., 2013). Dentre esses nematoides, destacando-se o *Haemonchus contortus* (CANTACESSI et al., 2012). Esta problemática somada à resistência desses parasitos frente aos anti-helmínticos predominantemente utilizados, considerando seu uso indiscriminado, tornou-se um desafio à comunidade científica das áreas veterinárias e agrárias, logo que tais problemas afetam diretamente a produção de caprinos e ovinos, bem como a saúde destes animais (CHAGAS et al., 2013). Cresce então, a busca por potenciais produtos bioativos para controle *H. contortus*, principalmente no que se refere à utilização de subprodutos industriais, sendo a indústria pesqueira promissora nesta linha.

A indústria pesqueira tem grande relevância para economia mundial, isto resulta de uma enorme quota no mercado internacional (BENHABILES et al., 2012). O Brasil apresenta um grande potencial para o desenvolvimento da piscicultura de água doce, devido as suas características geográficas e climáticas (IBGE, 2005). No entanto, a indústria pesqueira subutiliza seus materiais que são descartados sem tentativas de recuperação, geralmente ricos em enzimas digestivas que podem ser utilizadas em processos biotecnológicos (JYOTHIRMAYI, 2012; GUERARD et al., 2010).

Dentre as espécies de peixe importantes no Brasil, está a espécie *Hoplias malabaricus*, pertencente à família Erythrinidae (BLOCH, 1794), esta tem sido estudada por apresentar o hábito alimentar carnívoro, característica que favorece a produção de protease em seus cecos pilóricos. Estes peixes estão bem distribuídos em ambientes de água doce de todo território brasileiro, inclusive no Maranhão, garantindo assim a disponibilidade do mesmo na utilização de suas vísceras na busca por biomoléculas (COURTENAY; HENSLEY, 1979; TAPHORN, 1992, OYAKAWA, 2003).

Biomoléculas como proteases, tem sido alvo de estudos quando se refere a produtos naturais. Estas são proteínas com função catalisadora da hidrólise de outras proteínas.

Por serem biocatalizadores altamente específicos que apresentam uma eficiência catalítica na maioria das vezes muito maior que a dos catalisadores sintéticos ou inorgânicos (NELSON; COX, 2004). Dentre as enzimas, as proteases, são enzimas que catalisam a degradação de proteínas pela hidrólise de ligações peptídicas (PUENTE *et al.*, 2003), sendo está um importante elemento biológico, tornando assim um potencial biotecnológico. Neste estudo, foi descrito a obtenção de uma fração rica em protease obtida *Hoplias malabaricus*, investigou-se suas principais características bioquímicas e seu potencial anti-helmíntico sobre *Haemonchus contortus*.

## **2. Revisão bibliográfica**

### **2.1 Produção de caprinos e ovinos no Brasil**

A ovinocultura e caprinocultura são atividades bem exploradas em todo território nacional, com predominância na região do semiárido brasileiro (EMBRAPA, 2019). Segundo os dados da PPM 2018, apesar da caprinocultura e a ovinocultura serem criações presentes em todo Brasil, tais atividades estão mais concentradas na Região Nordeste, onde estão 93,9% do efetivo de rebanho caprino brasileiro. Com relação à ovinocultura, também se observa que a Região Nordeste apresenta uma alta participação em relação ao efetivo total de ovinos existentes no Brasil, com aproximadamente 66,7%. Essa predominância relaciona-se a alta adaptação dessas espécies às condições climáticas do semiárido nordestino e à sua tradição secular de criação e por ser um potencial na produção de carne, leite e de seus derivados, além do setor industrial no segmento de calçados e vestuários que usam a pele destes animais como matéria-prima (EMBRAPA, 2018; EMBRAPA, 2019). No Maranhão, no biênio (2017-2018), houve crescimento no efetivo total na criação de caprinos, com participação de 3,36%, ocupando o sétimo lugar no ranking nacional. Para ovinos, também apresentou crescimento, com participação de 1,54 %, ocupando o décimo terceiro lugar no ranking nacional (EMBRAPA, 2019).

### **2.2 *Haemonchus contortus***

#### *2.2.1 Aspectos gerais e significância econômica*

*Haemonchus contortus* é um helminto altamente patogênico, principalmente para pequenos ruminantes, que tem distribuição global. Por este apresentar ohábito hematófago, torna-se um potencial para desenvolvimento de doenças, sendo causa frequente de mortalidade (BESIER, 2016). Embora seja considerado um parasito de regiões tropicais, este tem se tornado cada vez mais importante em uma ampla gama de zonas climáticas, devido a sua adaptabilidade ecológica, proporcionada pelo seu elevado nível de polimorfismo genético e alto potencial biótico (BESIER, 2016). Além de suas características intrínsecas, as alterações climáticas podem também ser consideradas um

fator que proporciona o aumento da sua extensão geográfica, levando a um aumento da prevalência de haemonchosis em áreas atualmente de baixo risco(BESIER, 2016).

A haemonchosis é reconhecida, economicamente, como a mais importante doença parasitária de nematoide em suas zonas endêmicas (MCLEOD, 2004; PERRY et al., 2002),principalmente devido à ocorrência comum e potencial para alta taxa mortalidade em pequenos ruminantes. As perdas dos animais variam entre regiões, anose estações, dependendo das condições ambientais e da eficácia de medidas de controle, incluindo o impacto da resistência anti-helmíntica(BESIER, 2016). O impacto econômico imediato é maior quando os animais são criados em larga escala, para comercialização intensiva em áreas endêmicas. No entanto, as perdas ocorridas em sistemas pecuários tradicionais, podem ser proporcionalmente maiores em alguns casos, por ter como limitante osexacerbados períodos de má nutrição, a indisponibilidade e inacessibilidade de anti-helmínticos, bem como resistência aos mesmos (VATTA E LINDBERG, 2006).

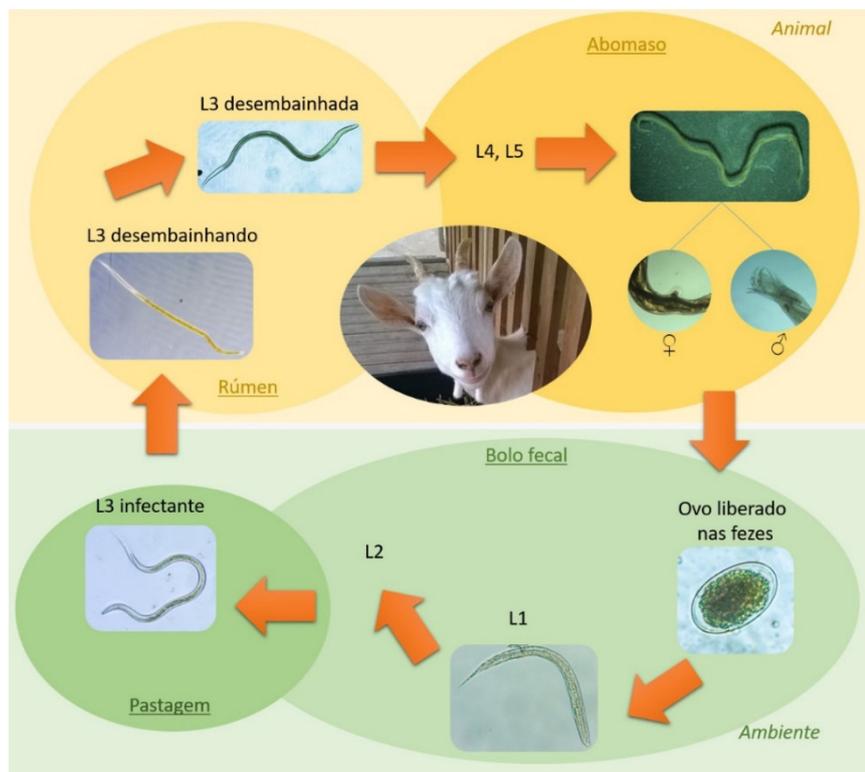
No Brasil, os rebanhos geralmente são criados de forma extensiva, sendo expostos à infecção por helmintos. Pode-se agravar este fato quando estes animais são criados em áreas que comportam altas lotações, gerando um aumento na contaminação ambiental, com elevada densidade populacional do parasito, elevando a ocorrência do estágio de vida livre do mesmo, que é responsável pela infecção do rebanho (AMARANTE; SALES, 2007).

O impacto da infecção crônica por *H. contortus* é difícil de avaliar, pois é mais significativo em situações extensas de pastoreio onde o monitoramento de rotina raramente é realizado, porém alguns autores como QAMAR et al. (2012) conseguiu relacionar perdas substanciais ao valor reduzido da produção animal, causada por *H. contortus*. A resistência anti-helmíntica do *H. contortus* está bem estabelecida em todas as principais zonas endêmicas, geralmente relacionados a grupos inteiros anti-helmínticos,exacerbando os custos e a complexidade do controle (BESIER, 2016; KOTZE, 2016).

### 2.2.2 Classificação e Ciclo de vida

*H. contortus* é um parasito pertencente ao filo Nematelminthes, Classe Nematoda, Ordem Strongylida, Família Trichostrongylidae e Gênero *Haemonchus* (FETTERER; RHOADS, 1998; MELO, et al., 2003; CARVALHO, 2011). Este parasito apresenta um ciclo de vida (Figura 1) com uma fase de vida livre e outra parasitária (JACQUIET et al., 1998).

**Figura 1.** Ciclo de vida do nematódeo gastrointestinal *Haemonchus contortus* representativo da família Trichostrongylidae. L: estágios larvais.



Fonte: Embrapa, 2019

A eclosão dos ovos na massa fecal dá início ao seu ciclo biológico. Esta é iniciada por estímulos ambientais e pelas enzimas da eclosão, liberadas pelo próprio embrião (ROGERS; BROOKS, 1977). No primeiro estágio (L1), as larvas rompem os ovos e se alimentam das bactérias presentes nas fezes dos ruminantes e passam duas mudas até alcançarem o estágio infectante, terceiro estágio (L3). Nesta fase as larvas adquirem motilidade, conseguem atingir as folhagens dos pastos, dos quais se alimentam os seus hospedeiros. Na fase parasitária há o processo de desembainhamento,

que ocorre após a ingestão das larvas pelo animal, advém do estímulo a secreção de fluido rico em enzimas promovendo a digestão da bainha e a liberação das larvas no abomaso (ROGERS, 1977). A L3 sofre outras duas mudas (L4 e L5) até atingir o estágio adulto (JACQUIET et al., 1998). Os adultos possuem tamanhos entre 1 a 3 cm de comprimento, podendo ser facilmente identificados devido a sua localização específica no abomaso (AMARANTE, 2004). Possuem uma cavidade bucal especializado com uma lanceta que permite fixar-se no intestino do animal (ALMEIDA, 1935).

### 2.2.3 Ecologia e distribuição geográfica

A exigência de condições ambientais quentes e úmidas para os estágios de vida livre de *H. contortus* direcionam a localização geográfica do parasito e suas distribuições sazonais. Desta maneira, a prevalência de *H. contortus* e as doenças causadas por este é, portanto, particularmente alta nas zonas climáticas tropicais (O'CONNOR et al., 2006). Contudo, o *H. contortus* provou ser extraordinariamente adaptável em uma ampla gama de ambientes (WALLER; CHANDRAWATHANI, 2005), devido ao seu alto potencial biótico que lhe permite aproveitar períodos curtos que são favoráveis para o seu desenvolvimento e a capacidade de sobrevivência do terceiro estágio larvar (Figura 3), e mecanismos adaptativos específicos, como hipobiose das larvas do quarto estágio (L4).

As mudanças climáticas vêm gerando diferentes pressões do ambiente sob o *H. contortus*, surgindo como consequência um alto nível de polimorfismo. Assim, o *H. contortus* ocorre em quase todas as regiões em que os pequenos ruminantes são criados, com potencial para surtos de haemonchosis, independentemente da zona climática. Devido à sua importância clínica e econômica, *H. contortus* é provavelmente o helminto de ruminante mais estudado em relação a fatores ecológicos que determinam a viabilidade de os estágios de ovo e larva (O'CONNOR et al., 2006). Em comparação com outros *tricostrongilídeos*, como *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus colubriformis*, os estágios de vida livre de *H. contortus* tem um requisito mais rigoroso para a umidade, uma tolerância menor a baixas temperaturas, e uma maior exigência e tolerância para temperaturas quentes (O'CONNOR et al., 2006).

### 2.2.4 Fisiopatologia e patogênese

A fisiopatologia de haemonchosis e sinais clínicos associados estão principalmente ligados à anemia que se desenvolve como consequência da atividade alimentar do parasito (DUNN, 1978; LEVINE, 1980; URQUHART et al., 1996). A perda de sangue começa com o desenvolvimento das larvas do quarto estágio (L4) (MONNIG, 1950; VEGLIA, 1915), estima-se que os indivíduos adultos conseguem remover 30 a 50 mL de sangue por dia (DARGIE; ALLONBY, 1975). A gravidade da doença está intimamente relacionada com o número de larvas de *H. contortus* que se estabelecem como há uma forte correlação entre a perda de sangue e o número de vermes adultos (LE JAMBRE, 1995). O resultado da infecção, portanto, depende em grande parte da taxa de ingestão de larvas infectantes (L3), a capacidade do hospedeiro de eliminá-los e a capacidade de substituir o sangue perdido. A anemia pode ser detectável entre os períodos de 10 a 12 dias após a infecção (DARGIE E ALLONBY, 1975; HUNTER; MCKENZIE, 1982).

Dependendo da intensidade da infecção e da resposta do hospedeiro, a haemonchosis foi categorizada em três síndromes gerais: hiperaguda, aguda e crônica (DUNN, 1978; URQUHART et al., 1996). Na forma hiperaguda relativamente rara, tem como característica a perda sanguínea maciça, com até 30.000 larvas de *H. contortus*, provocando uma gastrite hemorrágica, levando a uma anemia terminal (DUNN, 1978). Nestes casos, as mortes ocorrem de repente, pois não há sinais premonitórios da doença, mas com sinais de anemia grave em muitos dos sobreviventes. O diagnóstico é evidente na necropsia devido a números de vermes de diferentes estágios de desenvolvimento, além das numerosas hemorragias na superfície da mucosa (BESIER, 2016).

Na haemonchosis aguda, a anemia se desenvolve por um período mais longo, mas as mortes podem ocorrer dentro de 4 a 6 semanas de infecção, dependendo da taxa de ingestão de larvas. As cargas de *H. contortus* podem variar de 2000 e 20.000 vermes por hospedeiro (URQUHART et al., 1996). Na necropsia, a carcaça é pálida com ascites marcadas e edema submandibular, refletindo a hipoproteinemia que também resulta da atividade de alimentação de sangue de *H. contortus*. O sangue pode ser aguado e não coagular, a mucosa do abomaso é frequentemente edematosa com muco salpicado de sangue e sinais óbvios de apego do parasito. Dentre as alterações histopatológicas associadas à haemonchosis aguda incluem danos na superfície da mucosa e evidência

imunológicas de resposta celular (HUNTER E MCKENZIE, 1982; SILVERMAN E PATERSON, 1960).

Infecções com cargas menores, mas persistentes de *H. contortus* foram caracterizadas como "haemonchosis crônico" (ALLONBY; URQUHART, 1975; DUNN, 1978), que pode passar despercebido ou evidenciar-se apenas quando a ingestão de larvas e, conseqüentemente, a carga de vermes aumenta, ou quando as condições reduzem a capacidade do hospedeiro de tolerar os efeitos patogênicos (BESIER, 2016). A Haemonchosis crônico é mais comum em ambientes que são marginais para o desenvolvimento dos estágios de vida livre, ou durante períodos sazonais menos favoráveis em zonas endêmicas, geralmente é acompanhada de infecções por outros helmintos. A forma crônica de haemonchosis também pode ocorrer em locais em que é comum a manifestação de surtos (BESIER, 2016).

#### 2.2.5 Os anti-helmínticos com ação em ovos e seus mecanismo de ação

O desenvolvimento de drogas anti-helmínticas relevantes para área veterinária, iniciou-se há cerca de 50 anos (GEARY, 2004), com a descoberta do Levamisol (LEV). Outras drogas foram introduzidas, como as da classe dos benzimidazóis (BZs), considerada de grande prevalência na área (COLES, 2001). Os benzimidazóis são caracterizados por apresentar atividade de amplo espectro, com efeito ovicida, larvicida e em indivíduos adultos. Essa classe pode apresentar distintas formas de administração, como por via oral em suspensão, pasta, pó ou bolus intraruminal (MC KELLAR, 1990). Segundo Lacey (1990) estes medicamentos apresentam diversos efeitos nos níveis bioquímico e celular, mas seu principal modo de ação é sobre a proteína estrutural tubulina. A subunidade do microtúbulo, tubulina, é uma proteína dimérica composta por subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  de aproximadamente 50 kDa. A desintegração da matriz de microtúbulos normal foi relatada primeiramente por Borgers e De Nollin, estudos subsequentes confirmaram esta observação. Desta maneira, comprovou-se que a potente atividade dos BZs está efetivamente relacionada com a inibição da polimerização ou desintegração da matriz de tubulina.

O levamisol, por sua vez, é um anti-helmíntico colinérgico que apresenta efeitos no músculo, inicialmente relatado em *Ascaris suum* (ACEVES, 1970). Foi

demonstrado que esses medicamentos apresentam ação eletrofisiológica, produzindo seletivamente despolarização e paralisia espástica do músculo de nematóides parasitas (ROBERTSON, 1999; ROBERTSON, 2002; TRAILOVIC, 2002, 2005). Esses estudos identificaram que o levamisol abre os canais de íons seletivos de cátions nAChRs (nicotinic ACh receptors) da superfície celular do músculo nematóide, produzindo despolarização e contração muscular.

#### 2.2.6 Resistência anti-helmíntica do *H. contortus*

A resistência é geralmente definida como a capacidade de um organismo de sobreviver doses de droga que normalmente matariam organismos da mesma espécie. Em termos práticos, no que diz respeito à resistência a anti-helmíntica por parasitos nematóides do trato gastrointestinal, como *Haemonchus contortus*, a resistência pode ser vista como uma mudança na resposta a um tratamento medicamentoso, de tal forma que a eficácia é reduzida em comparação com o obtido quando a droga foi liberada para uso em campo. Para a *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (WAAVP), a resistência é considerada presente na população de teste se a redução percentual na contagem de ovos após o tratamento medicamentoso é  $< 95\%$ , e o nível de confiança inferior a  $95\%$  é  $< 90\%$ , medido em um teste de redução de contagem de ovos fecais (KOTZE, 2016). Resistência tem sido definida em termos de concentrações de drogas que inibem em algum aspecto de desenvolvimento ou motilidade em  $50\%$  ou  $99\%$  da população experimental de dose-resposta in vitro com estágios de vida livre (COLES et al., 2006).

*Haemonchus contortus* é o tricostrongilídeo mais estudado em relação à resistência anti-helmíntica, devido ter demonstrado a capacidade de desenvolver resistência a todas as principais classes de drogas; Desta maneira, esta problemática apresentada por esta espécie teve um impacto econômico significativo em escala mundial. No entanto, além do impacto econômico de sua resistência, esta espécie também tem sido mais estudada do que outras devido a seus aspectos biológicos e sua fisiologia (GILLEARD, 2006, 2013). Esses fatores incluem sua fecundidade, tamanho relativamente grande dos vermes adultos, a facilidade de estabelecer e manter grandes infecções de milhares de vermes em seus hospedeiros, e a disponibilidade de animais

simples e métodos eficientes na preservação dos estágios larvais de vida livre (BESIER, 2016; KOTZE, 2016).

*Haemonchus contortus* desenvolveu resistência a todas as classes de anti-helmíntico utilizados para seu tratamento (Benzimidazol, Salicilanilidas, Organofosfatos, Imidazotiazol, LactonasMacrociclicas, derivados de amino-acetonitrila) (DRUDGE et al., 1964; VAN WYK; GERBER, 1980; GREEN, 19981; LE JAMBRE, 1993; WOOSTER *et al.*, 2001). A capacidade dos produtores de controlar este parasito foi dificultada durante a década de 1990 e início de 2000 pelo surgimento de isolados mostrando resistência a múltiplos fármacos, isto é, resistência a três ou mais anti-helmínticos de diferentes classes de medicamentos (CEZAR et al., 2010; ECHEVARRIA et al., 1991, 1996; EDDI et al., 1996; LOVE et al., 2003; MACIEL et al., 1996; NARI et al., 1996; VAN WYK ; MALAN, 1988; VAN WYK et al. 1989, 1997, 1999). Nos últimos anos, a maioria dos isolados de campo mostra algum nível de resistência para Benzimidazois, imidazotiazois e LactonasMacrociclicas. Como os níveis de resistência a múltiplas drogas torna-se maior, o controle de *H. contortus* se tornará cada vez mais difícil (KOTZE et al., 2016).

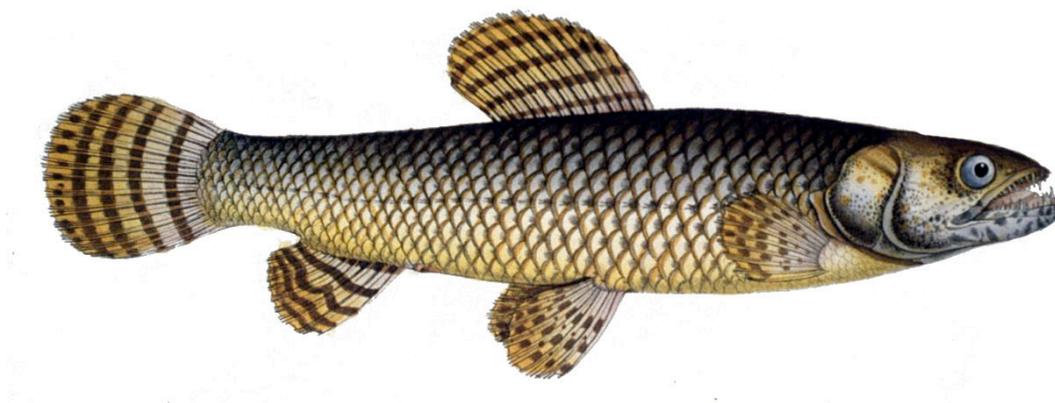
### **2.3 *Hoplias malabaricus***

A família Erythrinidae compreende alguns gêneros de peixes teleósteos neotropicais com ampla distribuição na América do sul. Atualmente é composta por três gêneros, sendo eles *Hoplerythrinus*, *Erythrinus* e *Hoplias*, apresentando um gênero extinto, *Paleohoplias assisbrasiliensis* (BRITSKI et al., 1986; GAYET et al., 2003). O gênero *Hoplias* é o mais amplamente distribuído ao longo de várias bacias hidrográficas brasileiras. Este grupo taxonômico é constituído por onze espécies de peixes carnívoros, para os quais os principais alimentos são outros peixes (LOUREIRO; HAHN, 1996; CARVALHO et al., 2002; ALVIM; PERET, 2004). A sua capacidade de dispersão e sua ampla distribuição são atribuídas a sua capacidade de sobreviver em ambientes com pouco oxigênio e / ou sua resistência durante longos períodos de jejum (OYAKAWA et al., 2006).

A espécie mais difundida deste taxon é *Hoplias malabaricus* (Figura 2), popularmente conhecido como traíra. Uma espécie de água doce e de hábito

preferencialmente noturno, que exibe grande plasticidade ecológica, com ampla distribuição em rios e reservatórios brasileiros, ocupando altos níveis tróficos, principalmente em ambientes lênticos (FOWLER, 1950; HENSLEY E MOODY, 1975; MORAES; BARBOLA,1995; REIS et al., 2003;). *Hoplias malabaricus* é facilmente encontrado em lagos temporários durante a estação seca (OKADA et al., 2003) devido à sua maior capacidade de sobrevivência em ambientes com baixo conteúdo de oxigênio e temperaturas extremas da água em comparação com outros peixes teleósteos piscívoros (RANTIN et al., 1992, 1993). Na estação chuvosa, *H. malabaricus* exibe alto grau de dispersão passiva, migrando de um trecho do rio para outro através de tiras de água, esta característica não é intrínseca à biologia dos peixes teleósteos, mas dependentes de fatores ambientais (RIOS et al.,2002).

**Figura 2.** Ilustração de espécime do peixe teleósteo *Hoplias malabaricus*.



Fonte: J. F. Hennig,1797

A traíra é um peixe carnívoro, predador generalista, que apresenta uma das maiores tolerâncias a jejum, sobrevivendo por períodos de até 180 dias sem redução nas taxas metabólicas (RIOS et al., 2005). Os tratos digestivos mais curtos, como observado em carnívoros, podem apresentar número de cecos pilóricos, que aumentam a área de superfície e compensam um intestino relativamente curto (BUDDINGTON et al., 1997; KUBITZA, 1999). Funcionalmente essas projeções, cecos pilóricos, aumentam a área de superfície para absorção de nutrientes (BUDDINGTON et al., 1997), mas também parecem ser locais de digestão com enzimas pancreáticas (BERGOT, 1981). Esta espécie possui três fases ontogenéticas em sua composição dietética: (1) uma fase planktivora para tamanhos menores que 20 mm de comprimento padrão, (2) um insetívorofase para tamanhos entre 20 e 100-120 mm e (3) uma fase piscívora para

amostras > 160 mm. Indivíduos dentro dos 100–160 mm têm uma dieta mista (AZEVEDO; GOMES, 1942; PAIVA, 1974; OLIVEROS; ROSSI, 1991; GALVIS et al., 1997; MESCHIATTI; ARCIFA, 2002). É facilmente utilizado como fonte alimentar por aves piscívoras e também por mamíferos, incluindo o homem (BARROS, 2007).

## **2.4 Indústria pesqueira e seus subprodutos**

A indústria pesqueira tem grande relevância para economia mundial, isto resulta de uma enorme quota no mercado internacional, com aproximadamente 140 milhões de produção de peixes, em que 110 milhões foram para consumo humano (BENHABILES et al., 2012). Nas últimas décadas, houve um grande aumento no consumo de produtos pesqueiros devido ao seu reconhecimento como alimento importante para uma dieta equilibrada, ajudando a manter um estilo vida saudável. O aumento do consumo de pescado cresce a uma taxa média anual de 3,2% (FAO, 2014).

O Brasil apresenta um grande potencial para o desenvolvimento da piscicultura de água doce, considerando que este é constituído por 5.500.000 hectares de reservatório de águas doces, aproximadamente 12% da água doce disponível em todo mundo, com clima favorável para o crescimento de espécies aquícolas, sem contar na crescente demanda por pescado no mercado interior e exterior (IBGE, 2005). A *Food Agriculture Organization* (FAO) estima que o Brasil deva registrar um crescimento de 104% na produção de pescado e aquicultura em 2025. O aumento na produção brasileira será o maior registrado na região, seguido de México (54,2%) e Argentina (53,9%) durante a próxima década. O crescimento no país se deve aos investimentos feitos no setor nos últimos anos (FAO, 2016).

No entanto, a indústria pesqueira subutiliza seus materiais que são descartados sem tentativas de recuperação e que representa mais de 60% da biomassa pescada (JYOTHIRMAYI, 2012; GUERARD et al., 2010). De acordo com relatórios da FAO, cerca de 21,7 milhões de toneladas de resíduos de processamento de peixe foram descartados em 2012 (FAO, 2014). Os resíduos de peixe são constituídos de proteína (15-30%), gordura (0-25%) e água (50-80%) (GHALY et al., 2013). Esses subprodutos incluem carcaça (15–20%), pele e barbatanas (1–3%), ossos (9–15%), cabeças (9–12%), vísceras (12–18%) e escamas (5%) (MARTÍNEZ-ALVAREZ, CHAMORRO; BRENES, 2015). Os músculos e tecidos de peixes são compostos por proteínas

miofibrilares e sarcoplasmáticas (HAYES; FLOWER, 2013). As carcaças são ricas em colágeno e gelatina (KARIM; BHAT, 2009). A fração lipídica dos resíduos contém ômega-3, fosfolipídio, colesterol e vitaminas lipossolúveis (RAI, SWAPNA, BHASKAR, HALAMI; SACHINDRA, 2010). As vísceras (figura 3) são fontes ricas em várias enzimas, como proteases, pois é onde ocorre digestão em peixes. Estas enzimas são responsáveis pela hidrólise de proteínas (EROLDOĞAN et al., 2008). Estudos revelam que as enzimas disponíveis em resíduos peixes incluem: pepsina, trisina e quimotripsina (ZHOU et al., 2011). A subutilização desses subprodutos geram algumas problemáticas como o custo associado à eliminação de resíduos de peixe e a poluição ao ambiente. Para sanar tais problemas, estes resíduos podem ser utilizados em produtos de valor agregado, como proteínas, óleos, aminoácidos, minerais, enzimas, hidrolisados, peptídeos bioativos, colágeno e gelatina (DAVE, 2013).

**Figura 3.** Ceco pilórico de exemplar do peixe teleósteo *Hoplias malabaricus*.



## 2.5 Proteases

### 2.5.1 *Geral*

As proteases constituem o grupo mais importante de enzimas industriais, por apresentarem diversas aplicações biotecnológicas, representando pelo menos 60% de todas as vendas de enzimas industriais de todo mundo, pois são ferramentas chave em biotecnologia e áreas afins devido à sua natureza catalítica (FRAATZ et al., 2014; JEMLI et al., 2016). Desta forma, elas têm sido amplamente utilizadas em várias aplicações industriais, como na indústria de detergente, alimentos, produtos farmacêuticos, couro e seda, tratamento de resíduos e síntese de peptídeos bioativos (GUPTA et al., 2002; AISSAOUI et al., 2016). Segundo a IUBMB as proteases estão inseridas no grupo das hidrolases, por estas apresentarem uma reação de hidrólise que clivam as proteínas adicionando uma molécula de água à ligação peptídica (BERG et al., 2004). Essas enzimas são classificadas com base em três critérios principais, sendo eles: (a) tipo de reação catalisada; (b) Natureza química do sítio catalítico; (c) estrutura (BARETT, 1994). De modo geral, as proteases podem ser divididas em dois grupos: Exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases agem próximo das extremidades das cadeias polipeptídicas, enquanto as endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias (BARETT, 1994; RAO et al., 1998).

As proteases podem também ser classificadas de acordo com o intervalo de pH no qual tem atividade mais elevada. São denominadas de proteases ácidas as com maior atividade entre pH 2- 6, proteases neutras entre pH 6-8 e proteases alcalinas apresentam alta atividade entre pH 8-13(RAO et al., 1998; SOUSA et al, 2015). De acordo com seu mecanismo de catálise, as proteases podem ser classificadas como: proteases serínicas, proteases aspárticas, proteases cisteínicas, e metaloproteases. As proteases serínicas possuem em seu sítio ativo o grupo serina, ativas geralmente em pH neutro e alcalino, com atividade do pH 7-11. Proteases aspárticas são geralmente proteases ácidas, endopeptidases e apresentam resíduos de ácido aspártico em seu sítio ativo. As proteases cisteínicas possuem em seu sítio catalítico os três aminoácidos: cisteína, histidina e asparagina. Já as metaloproteases são caracterizadas pela necessidade de íons metálicos bivalentes para exercerem atividade catalítica (SOUZA et al, 2015; MANDUJANO-GONZÁLEZ, 2016)

### 2.5.2 *Proteases de pescados*

Os animais aquáticos adaptaram-se a diferentes condições ambientais, e essas adaptações resultaram na produção de proteases digestivas com propriedades únicas. Dentre essas características estão a de alta atividade em uma ampla faixa de pH (2,0–11,0), condições de baixa temperatura (30–65 ° C). Além de enzimas com estrutura mais flexíveis, o que garante a maior atividade catalítica e menor termoestabilidade (SIMPSON, 2000; SHAHIDI; KAMIL, 2001). Tais proteases especializadas somadas a grande de quantidade de vísceras descartas pelas indústrias pesqueiras, tornam-se as proteases destes teleósteos potencialmente viáveis para produção em larga escala (BEZERRA, 2001a).

A atividade enzimática das proteases de peixes depende de fatores abióticos como a temperatura (KUZ'MINA, 1996), horários(KUZ'MINA; STRELNIKOVA, 2008) e sazonalidade (KOFUJI et al., 2005). E também de fatores bióticos, como a preferência alimentar (UGOLEV; KUZ'MINA, 1993), idade (KUZ'MINA, 1996) e infestação com parasitos (IZVEKOVA; SOLOVYEV, 2012). Desta maneira, o conteúdo enzimático depende das características físico-químicas do ambiente interno dos peixes, da qualidade e da quantidade de nutrientes(LAZO et al., 2007; MURASHITA et al, 2015).

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Geral**

Avaliar o efeito anti-helmíntico de proteases obtidas a partir dos cecos pilóricos de *Hoplias malabaricus* sobre *Haemonchus contortus*.

#### **3.2 Específicos**

- Obter uma fração rica em proteases de extratos das vísceras de Traíra (*Hoplias malabaricus*);
- Caracterizar a fração proteolítica, quanto a seu pH e temperatura;
- Avaliar o efeito da fração proteolítica sobre a eclodibilidade de ovos de *Haemonchus contortus*.

### **4. Materiais e métodos**

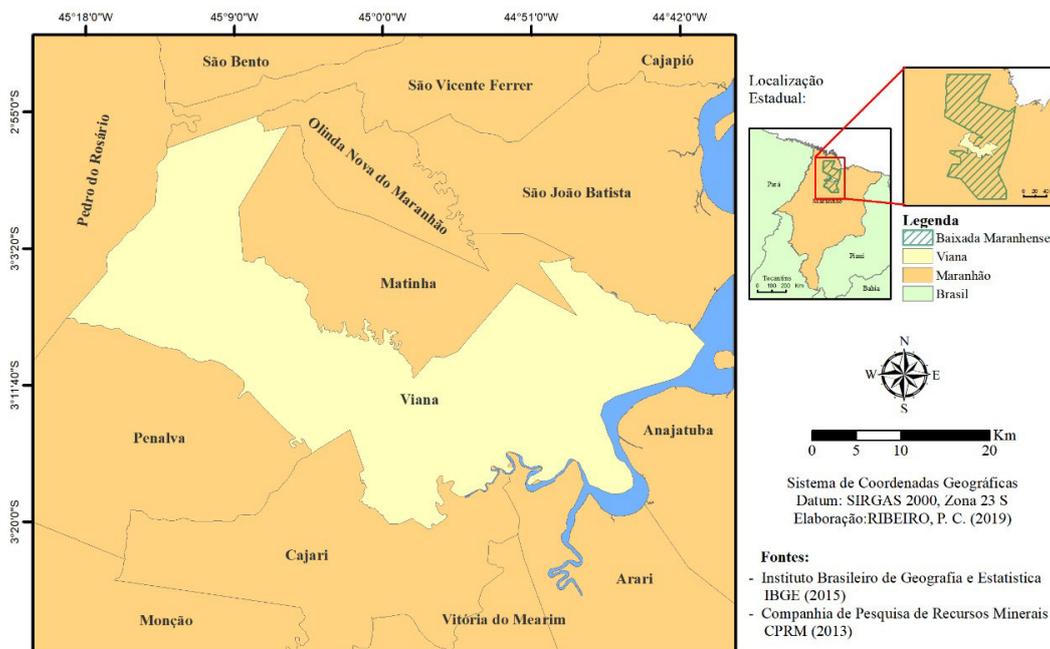
#### 4.1 Obtenção dos exemplares

Exemplares de *Hoplias malabaricus* foram adquiridos no município de Viana (Latitude 30° 12' 26" Sul e Longitude: 44° 59' 57" Oeste), na Baixada Maranhense (Figura 4). Coletas iniciais foram feitas para padronização dos testes, todas em período chuvoso. Os peixes foram selecionados pelos seguintes critérios: chave de identificação, integridade corporal e com vísceras visualmente saudáveis; e com critérios de exclusão: excesso de carga parasitária (nematóides). Os peixes selecionados foram acondicionados em gelo, e foram medidos com régua em poliestireno 30 cm, pesados em balança digital portátil, e tiveram os cecos pilóricos removidos. Os cecos foram pesados a cada 5 peixes e armazenados em embalagens plásticas, acondicionadas em gelo, até o transporte para o laboratório, em que foram armazenados a -20 °C.

#### 4.2 Preparo do extrato bruto

As vísceras de *Hoplias malabaricus* foram homogeneizadas com solução Tris-HCl 0,01M, pH 8,0; utilizando homogeneizador de tecidos. O material resultante desse processo foi centrifugado. O sobrenadante obtido foi denominado extrato bruto (EB).

**Figura 4.** Mapada área de obtenção dos exemplares.



#### 4.3 Obtenção de uma fração enriquecida em proteases.

O extrato bruto foi precipitado com sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (SIGMA), para biologia molecular,  $\geq 99.0\%$ ; CAS: 7783-20-2, empregando os seguintes intervalos de saturação: 0-30; 30-60; 60-90%. A fração com maior atividade proteolítica foi denominada FP (fração enriquecida com proteases). O extrato e as frações obtidas foram exaustivamente dialisadas e liofilizados.

#### 4.4 *Quantificação de proteínas*

A quantificação de proteínas solúveis no extrato e frações proteicas foi feita segundo Bradford (1976). Uma curva padrão com quantidades conhecidas de albumina sérica bovina (BSA) foi preparada.

#### 4.5 *Atividade proteolítica*

O substrato utilizado para determinação de atividade proteolítica foi uma solução de azocaseína 1% preparada em tampão (LEIGHTON et al. 1973). A solução enzimática foi adicionada ao substrato com a adição de Dithiothreitol-DTT e encubada em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$  durante uma hora. Após período reacional, a reação foi interrompida com a adição de ácido tricloroacético-TCA 20% (JOHNVESLY; NAIK, 2001). Para determinar a atividade usaram-se os seguintes cálculos:  $\text{UAP} = \text{ABS} / 0,01$  (Em que UAP: Unidade de atividade proteolítica e ABS: Valor médio da absorbância);  $\text{UAP/mL} = \text{UAP} \cdot 1000 \mu\text{L} / \text{VT} \mu\text{L}$  (Em que VT: Volume de amostra em microlitros utilizada no teste);  $\text{UAP/mgP} = \text{UAP/mL} / [ ] \text{mgP}$  (Em que mgP: Miligrama de proteína).

#### 4.6 *Efeitos de pH e temperatura na atividade proteolítica*

O pH ótimo da FP foi determinado em tampões 25 mM com valores de pH variando entre 2 a 12: glicina/HCL pH 2,0; acetato de Sódio pH 4; fosfato de Sódio pH 6; Tris/HCl com variações de pH de 8 a 10 e glicina/NaOH com pH 12. Após intervalos de tempo de 60 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , alíquotas foram retiradas para determinação da atividade enzimática.

Foram simuladas diferentes condições de temperaturas para teste de atividade e estabilidade das proteases. A FP foi incubada em temperaturas entre 25 e  $80^\circ\text{C}$ , a atividade proteolítica concernente à variação de temperatura foi determinada incubando-

se percentuais de amostra, tampão e substratos específicos, em banho-maria durante 60 minutos.

#### 4.7 Teste de eclodibilidade de ovos *Haemonchus contortus*

Este ensaio foi baseado no método descrito por Coles et al. (1992). As amostras foram testadas em concentrações proteicas pré-padronizadas (29,71; 14,85; 7,42; 3,71; 1,85  $\mu\text{g/mL}$ ) em quadruplicata. Em que usou-se 250  $\mu\text{l}$  de ovo em suspensão, contendo aproximadamente 100 ovos frescos, foi incubada por 48 h 27 ° C e  $\geq 80\%$  de umidade relativa (UR), com 100  $\mu\text{l}$  da FP. Gotas de Lugol (50 $\mu\text{L}$ ) foram adicionadas para parar a reação. Larvas em estágio (L1) e ovos foram quantificadas para calcular a percentagem de inibição eclodibilidade dos ovos de *H. contortus*. Para controle negativo usou-se o tampão de diluição das amostra (PBS).

#### 4.8 Análise estatística

A quantificação de proteínas e a atividade proteolítica foi realizada em triplicata e os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Para o ensaio anti-helmíntico, realizados em quadruplicata, os dados foram inicialmente transformados em Log (X), normalizado. Posteriormente o IC50 para inibição de eclodibilidade de ovos foi calculado usando GraphPad Prism 7 (GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA) e expressos como média e intervalo de confiança (95%). Com o nível de significância em 0,05%. (Roditakis et al. 199 2005).

## 5. Resultados e discussão

### 5.1 Biometria dos espécimes *Hoplias malabaricus* selecionados

Após coletas para padronizar a obtenção da fração proteolítica, foi realizada uma coleta e quinze (15) peixes foram utilizados para executar os testes. Os espécimes de *Hoplias malabaricus* (figura 5) obtidos foram distribuídos em três grupos (n=5), para que o teste fosse realizado em triplicata. Os dados de biometria foram descritos na tabela 1. Em geral, o comprimento total dessa espécie no Nordeste brasileiro varia de 12,0 a 41,5 cm (LIMA et al., 2017), como visto no trabalho de Pacheco et al (2017), em que os espécimes coletados tinham comprimento médio de 22,83 cm. Esse padrão também foi observado nos trabalhos de CORRÊA et al., (2013) e Antonetti et al., (2014), em que os valores de comprimento médio desses peixes foram de 25,5 cm e 26,4 cm, respectivamente.

**Figura 5.** Exemplar do peixe *Hoplias malabaricus* coletado no município de Viana, Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil.



Neste estudo, os dados coletados corroboram com a literatura, considerando que a média do comprimento dos espécimes coletados foi de 18,8 cm. Em relação ao peso dos espécimes de *H. malabaricus* no nordeste varia de 18,0 g a 1028,0 g (LIMA et al., 2017). Neste trabalho, o peso médio dos espécimes coletados foi de 121,2g. Outros estudos legitimam esse dado, em que seus pesos médios foram de 130,77g (PACHECO et al., 2017), 207 g (CORREA et al., 2013) e 679,1g (ANTONETTI et al., 2014). A relação corpórea (peso-comprimento) dos peixes coletados foi de 25,16.

**Tabela 1.** Biometria dos espécimes de *Hoplias malabaricus*.

GRUPOS	PESO	TAMANHO	PESO CECO
--------	------	---------	--------------

<b>Grupo 1</b>	126,8 ±52,09	20,9 ±3,57	4,897 g
<b>Grupo 2</b>	114,0 ±16,64	18,1 ±1,14	7,615 g
<b>Grupo 3</b>	122,8 ±41,10	17,4 ±1,91	3988 g

### 5.2. Quantificação e atividade proteolítica

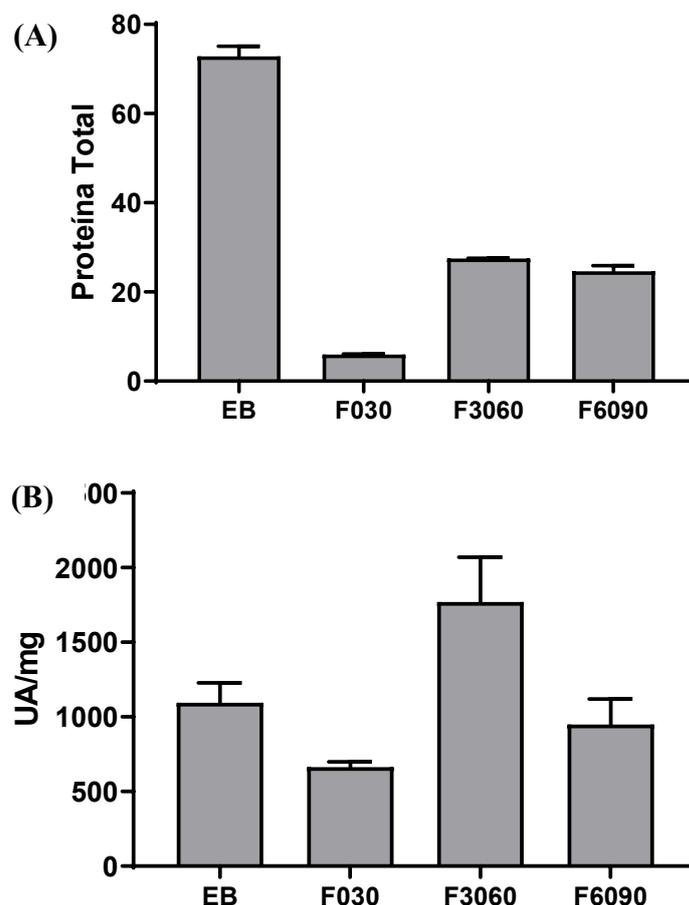
Na quantificação de proteínas pelo método de Bradford observa-se teor significativo de proteínas totais nas amostras do extrato bruto (EB) em as frações. Em que o EB, F030, F3060 e F6090, apresentaram 72,86, 5,96, 27,49, 25,67 mgPT, respectivamente (Figura 6A). Esses dados demonstram que houve eficiência na precipitação com sulfato de amônio, logo que o quantitativo de proteína no extrato bruto está bem distribuído entre as frações, com 81,14% de recuperação protéica, maior quando comparada a recuperação realizada no trabalho de Bezerra (2005), que obteve 77,1 % após precipitação por sulfato de amônio nas frações 0-30% (1,68 mgP), 30-80% (18,68 mgP) e final (252,78 mgP) de um extrato bruto com 354 mgP após tratamento térmico.

**Tabela 2-** Rendimento do peso do ceco e de recuperação proteica expresso como mgP (miligrama de proteína).

	(g) de ceco/ peixe	(g) de ceco/kg de peixe	(mgP)/peixe	(mgP)/Kg de peixe	(mgP)/ (Kg) de ceco
<b>EB</b>	1,10 g	9,08 g	14,57 mgP	120,23 mgP	13246,0 mgP

A precipitação de proteínas pelo sulfato de amônio se baseia no princípio de *salting out*, que é a capacidade de remover proteínas do estado solúvel por adição de sal. Este método está associado às interações iônicas entre sal, água e proteína. As proteínas formam ligações de hidrogênio com moléculas de água, com a adição de íons pequenos e altamente carregados, como sulfato de amônio, há competição entre os íons de sal e as proteínas para interagir com as moléculas de água. Se a concentração de íons de sal for suficientemente alta, a ligação de hidrogênio entre a proteína e a água é interrompida, diminuindo a solubilidade das proteínas e aumentando as interações proteína-proteína que levará a precipitação destas (MARIAN, 2015).

**Figura 6.** Gráfico da concentração proteica e atividade proteolítica do extrato bruto e das frações proteolíticas das vísceras da espécie de peixe *Hoplias malabaricus*. (A) Teor de proteína total do extrato bruto (EB) e frações (F030; F3060; F6090) de *Hoplias malabaricus*, expresso como mgPT (miligrama de proteína total). (B) Atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato. Atividade expressa pela unidade de Atividade Proteolítica/ Miligrama de Proteína (UAP/mgP).



Através do teste de atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato, determinou-se que a atividade proteolítica no EB, F030, F3060, F6090 foi respectivamente de 1095,83, 662,96, 1769,23 e 949,61 UA/mgP. Observou-se que a maior recuperação enzimática foi observada na F3060 (30-60% saturação com sulfato de amônio) (Figura 6B). Definiu-se assim a F3060 (30-60%) como (FP). Esse dado se assemelha aos trabalhos de El-beltagy (2004), Balti (2009), Marcuschi et al (2010), Shi et al (2006), em que dentre as amostras que expressaram a reação de hidrólise proteica, verificou-se que o precipitado 40-60% de concentração salina obteve o maior valor de atividade. A fração enriquecida de proteases (FP) pode ser interessante à indústria

farmacêutica, considerando que esta não apresentar tantos passos de purificação tem baixo custo, e continua apresentando atividade.

A atividade específica aumentou ao longo do processo de purificação, indicando que a maioria das impurezas indesejadas foram removidas, como apresentado na tabela 2, o que demonstra eficiência neste processo por meio da precipitação com sulfato de amônio. Esses resultados foram semelhantes aos estudos com purificação de proteases de outras espécies de peixe como: *Sepia officinalis* (BALTI et al, 2009), *Colossoma macroporum* (MARCUSCHI et al, 2010) e *Macruronus novaezealandiae* (SHI et al, 2007). A precipitação com sulfato de amônio é uma técnica normalmente adotada na fase inicial da purificação de proteína, em que uma elevada recuperação protéica é geralmente obtida a partir desse método, antes mesmo das enzimas serem submetidas à purificação subsequente (MARIAN et al., 2015).

**Tabela 3.** Resumo da purificação parcial de proteases a partir de exemplares de *Hoplais malabaricus*. Em que **mgP**: proteína total em miligramas; **UA/mgP**: Atividade de específica em unidade de atividade por miligrama de proteína.

<b>Amostras</b>	<b>Proteína total (mgP)</b>	<b>Atividade específica (UA/mgP)</b>	<b>Purificação</b>
EB	72,86	1095,83	1
F030	5,96	662,96	0,604
F3060	27,49	1769,23	1,614
F6090	25,67	949,61	0,866

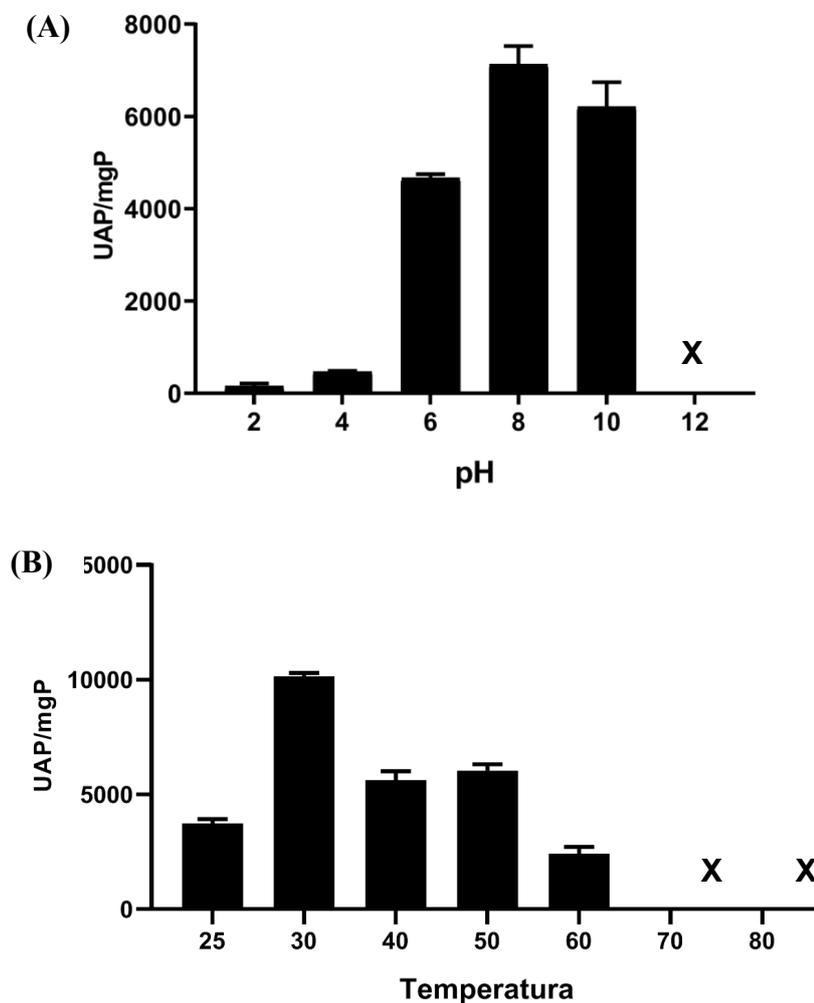
### 5.3 Determinação de pH e temperatura ideais da fração proteolítica

Avaliaram-se as características físico-químicas da fração enriquecida de proteases do ceco pilórico de *H. malabaricus*. A atividade protease da FP de ceco pilórico de *H. malabaricus* foi determinada em diferentes valores de pH de 2,0 a 12,0, estes testes para definição do pH ótimo mostraram maior atividade enzimática na faixa de pH de 6-10, mostrando maior atividade no pH 8, apresentando atividade relativa nos pH 6 e 10 e redução das atividades nos valores de pH 2 e pH 4 (figura 7A). Este resultado é corroborado com outros trabalhos, que demonstraram alta atividade de enzimas

digestivas de *Raja. clavata*(LASSOUED, 2015),*Salaria basilisca*(KTARI, 2012), espécies diversas(SARANYA, 2016),*Chelon labrosus*(PUJANTE, 2017), nesta faixa de pH. Observa-se também que em valores extremos de pH (seja a variação para cima ou para baixo), houve a redução considerável da atividade. Isso pode ser atribuído às mudanças conformacionais na proteína causada por repulsão de cargas (KLOMKLAO et al., 2009). Este efeito é também compreendido pelo estudo mecanístico da triade catalítica, uma vez que nos valores de pH abaixo de 6 os resíduos de histidina começam a sofrer a desprotonação do hidrogênio ligado ao nitrogênio (SANTOS, 2016). A partir do pH 10-12 todos os aminoácidos se mostram desprotonados conferindo à molécula uma perturbação estrutural desencadeado pelo excesso de cargas negativas distribuídas ao longo da mesma (SANTOS, 2016). O pH ótimo as proteases para diferentes espécies de peixes é determinada pela localização anatômica na qual estas foram extraídas e características genéticas da espécie (VANNABUN E RAWDKUEN, 2012). Estes resultados sugerem que a víscera de *H. malabaricus* seria uma fonte potencial de proteases para algumas aplicações industriais que exigem condições alcalina.

Da mesma forma que o pH conseguiu desempenhar mecanismos de hidrólises diferenciado para proteases do *H. malabaricus*, a temperatura também possibilita diferentes efeitos tanto beneficiamento, como para depleção da estrutura nativa. A atividade de enzimas proteolíticas foi determinada em diferentes temperaturas que variaram entre 25- 80°C, os testes mostraram maior atividade na faixa de 30-50°C (Figura 7B), semelhante a proteases encontradas em outras espécies de peixes, como *Colossoma macropomum* (BEZERRA et al., 2001),*Oreochromis niloticus* (BEZERRA et al., 2005), *Scorpaena Notata* (AISSAOUI, 2017). A temperatura ideal para as proteases de *Hoplías malabarucusz* foi menor que a de *R. clavata* (LASSOUED, 2015) e *Lithognathus mormyrus* (EL-HADJ, 2011), que exigem 50°C e de *S. basilisca* (KTARI, 2012), que exibiu uma temperatura ótima a 60 °C. Neste trabalho, temperaturas altas como 50 e 60 °C, as enzimas apresentam diminuição da atividade enzimática, devido à desnaturação (LASSOUED, 2015). Altas temperaturas quebram as ligações di-sulfeto perdendo a estrutura terciária da enzima e, portanto, tornando a enzima não funcional. Proteases oriundas de resíduos de peixe com sua atividade ótima em torno da temperatura ambiente pode caracterizar uma vantagem economica, logo que reduz o custo de energia durante o processo.

**Figura 7.** Determinação de pH e temperatura ideais da fração proteolítica. (A) Efeito do pH na atividade proteolítica da FP; (B) Efeito da temperatura na atividade proteolítica da FP. Utilizando azocaseína como substrato. Atividade expressa pela unidade de Atividade Proteolítica/ Miligrama de Proteína (UAP/mgP)

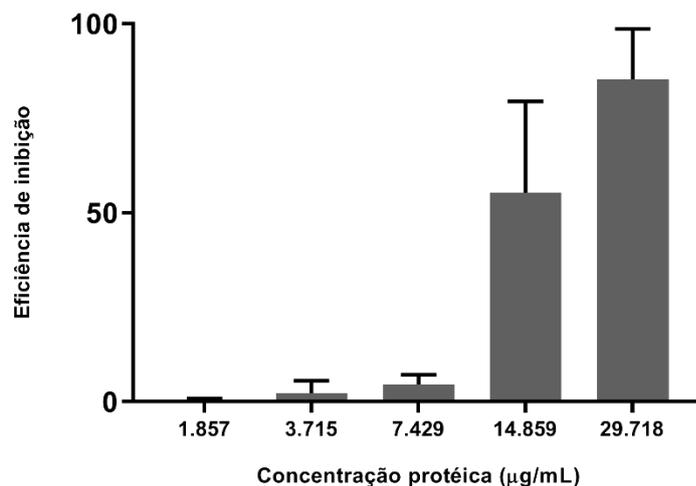


#### 5.4 Inibição da eclosão de ovos de *Haemonchus contortus*

Para avaliar o efeito da PF na eclodibilidade de ovo de *Haemonchus contortus*, baseou-se no método descrito por COLES et al. (1992). Foram testadas diferentes concentrações da FP (29,71; 14,85; 7,42; 3,71; 1,85 µg/mL) obtida do fracionamento de extrato de víscera de *Hoplias malabaricus* contra ovos de *H. contortus*. O produto apresentou eficácia em termos de inibição da eclodibilidade de ovos de *H. contortus*, como mostrado na figura 8, que apresentou uma perfil de dose dependência, com valor de IC<sub>50</sub> de 14,6 µg/mL. O mesmo foi visto com proteases extraídas de diferentes partes

da planta *Spigelia anthermia*, que inibiu a eclodibilidade de ovos de *H. contortus*, com IC50 valores de 0,17, 0,65 e 0,79 mg/mL para Fração proteica folha (LPF), Fração proteica caule (SPF) e Fração proteica raiz (RPF), respectivamente (ARAÚJO, 2017).

**Figura 8.** Gráfico do teste de inibição da eclodibilidade dos ovos de *Haemonchus contortus*. Sendo o produto inibidor a FP. Em concentrações de 29,71; 14,85; 7,42; 3,71; 1,85  $\mu\text{g/mL}$ . Para controle usou-se o tampão de diluição das amostras (PBS).



O estágio de ovo dos nematóides é muito importante no ciclo de vida do parasito, tanto na perspectiva de desenvolvimento deste, quanto como alvo potencial para aplicação de estratégias de controle. Os ovos eclodem após uma embrionação de 24 a 48 horas, liberando uma larva de primeiro estágio, decorrente a combinação de eventos mecânica e enzimáticos (MANSFIELD, 1992). O teste de eclodibilidade demonstra a inibição desta etapa, interrompendo o ciclo de vida destes parasitos. O revestimento dos ovos de nematóide é formada por três camadas, sendo estas de lipídio (interno), quitina (média) e vitelina (externa), sendo a camada quitinosa a mais espessa (HUANG, 2004). Em um estudo feito em 1992 por Mansfield, demonstrou-se que o tratamento com protease afetou todas as três camadas do revestimento do ovo de *Haemonchus contortus*, indicando que essa camada era composta em grande parte por proteínas (MANSFIELD, 1992).

Estudos demonstram que as proteases podem agir efetivamente sobre ovos de nematóides, como visto no trabalho Bonants (1995), que purificou uma protease serínica do fungo *P. lilacinus* por cromatografia de afinidade, que quando incubada com

ovos de nematóides influenciou significativamente em seu desenvolvimento. Estudos de microscopia de transmissão eletrônica revelaram que a protease isolada de *P. Lilacinus* alterou a estrutura da revestimento dos ovos do nematóide *Meloidogyne hapla*, em que a camada lipídica interna foi desintegrada, e a camada de quitina média tornou-se mais fina do que na controles negativos. Nas análises dessas proteases com ação sobre o ovo de nematóide, estas compartilham características como seu peso molecular principalmente entre 32 e 38 kDa, sendo elas serínicas; com sua atividade máxima obtida em situação alcalina; e degradam as proteínas do nematoide, podendo danificar o revestimento de seus ovos ou em fase adulta (HUANG, 2004).

Outros trabalhos relacionados ao ensaio nematicida de proteases comprovam a eficiência destas enzimas também agindo sobre as larvas. Como visto na pesquisa de Junwei (2013), em que demonstrou-se que proteases apresentam efeitos nematicidas significativos nas larvas do nemátodo de vida livre *C. elegans* e no nemátodo parasita animal *H. Contortus*. Segundo Junwei (2013) as proteases agem danificando a cutícula do parasito, resultando assim em sua morte. A cutícula dos nematodes são estruturas complexas compostas com uma alta porcentagem de proteínas, na qual o colágeno é o principal componente estrutural, sendo um alvo para proteases. No estudo feito por GENIER (2015), observou-se redução significativa ( $p < 0,05$ ) de 42% no número de larvas de *Panagrellus sp.* Ou como visto no trabalho de SOARES et al. (2013), em que utilizaram proteases do fungo nematófago *Monacrosporium sinense* em larvas de *Panagrellus redivivus* e observou que as enzimas purificadas destruíram mais de 90% das larvas submetidas ao tratamento. Está bem descrito na literatura a eficiência das proteases de fungos no controle de nematoide, logo que este é uma importante praga agrícola, e os fungos agem em simbiose com as plantas, defendendo-as contra esse parasita, porém não há trabalhos cuja a fonte de protease com ação nematicida seja subprodutos de peixes.

As proteases são de fundamental importância para os nematóides, uma vez que estão envolvidas na eclosão de ovos (ROGERS; BROOKS, 1977; MANSFIELD et al., 1992), desembanhamento (DAVIS et al, 2004; STEPEK et al., 2011; PAGE et al., 2014), degradação do tecido alvo no momento da penetração no hospedeiro (GADAHY et al., 2016), e no processo de muda (PAGE et al, 2014). Além das proteases, outras

enzimas como, quitinases e colagenases, estão relacionadas com o controle dos nematódes (LIANG, 2010).

## 6. Considerações finais

Este trabalho de extração de protease das vísceras de *Hoplias malabaricus* permitiu compreender melhor algumas características da fração enzimática, bem como legitimar a eficiência de técnicas como a precipitação com sulfato de amônio, que foi satisfatória para semi-purificação. Podemos afirmar que a traíra (*Hoplias malabaricus*), além de ser uma espécie economicamente importante para as populações tradicionais do Município de Viana, é um peixe fonte de biomoléculas aplicáveis à indústria, considerando as suas características físico-químicas. As vísceras deste animal que seriam descartadas, podem passar por processamento para obtenção de proteases que podem ser aplicadas em diversas indústrias, diminuindo assim o desperdício deste subproduto e a poluição gerada por estes. Neste estudo, comprovou-se que a fração enriquecida de protease extraída de *Hoplias malabaricus*, apresentou ação anti-helmíntica relacionada a inibição da eclodibilidade dos ovos de *H. Contortus*, mostrando-se promissora para indústria farmacêutica, no que se refere a produção de novos anti-helmínticos, tanto pelo seu alto potencial, bem como pela sua característica natural, o que seria benéfico ao ambiente e de extrema importância para saúde de pequenos ruminantes, nos remetendo a interface entre saúde e ambiente.

## Referências

Aceves, J., Erlij, D. and Martinez-Maranon, R. (1970). The mechanism of the paralyzing action of tetramisole on *Ascaris* somatic muscle. *British Journal of Pharmacology* 38, 602–607.

AISSAOUI, N.; ABIDI, F.; HARDOUIN, J.; ABDELKAFI, Z.; MARRAKCHI, N.; JOUENNE, T.; MARZOUKI, M. N. Two Novel Peptides with Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory and Antioxidative Activities from *Scorpaena Notata* Muscle Protein Hydrolysate. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 10.1002/bab.1478, 2016.

ALLONBY, E.W.; URQUHART, G.M. The epidemiology and pathogenic significance of haemonchosis in a Merino flock in East Africa. **Vet. Parasitol.** 1, 129-143, 1975.

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

ALVIM, M.C. C. ;PERET, A. C. Food resources sustaining the fish fauna in a section of the upper São Francisco River in Três Marias, MG, Brazil. **Braz J Biol**; 64(2): 195-202, 2004.

AMARANTE, A. F. T. Controle Integrado De Helminthos De Bovinos E Ovinos. In: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, 13, Ouro Preto. Anais. Ouro Preto, p. 68-71, 2004.

AMARANTE, A. F. T.; SALES, R. O. Controle de endoparasitoses dos ovinos: uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 1, n. 2, p. 14-36, 2004.

ANTONETTI, D. A.; LEAL, M. E.; SCHULZ, U. H. Technical contribution: Length-weight relationships for 19 fish species from the Jacuí, Delta, RS, Brazil. **J. Appl. Ichthyol.** 30 259–260, 2014.

ARAÚJO, S. A.; DOS SANTOS SOARES, A. M.; SILVA, C. R.; JÚNIOR, E. B. A.; ROCHA, C. Q.; DA SILVA FERREIRA, A. T.; COSTA-JÚNIOR, L. M. In vitro anthelmintic effects of *Spigelia anthelmia* protein fractions against *Haemonchus contortus*. *PloS one*, v. 12, n. 12, p. e0189803, 2017.

AZEVEDO, P.; GOMES, A. L. Contribuição ao estudo da biologia da traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794). **Boletim de Indústria Animal**, 5, 15–64, 1942.

BALTI, R.; BARKIA, A.; BOUGATEF, A.; KTARI, N.; NASRI.; MONCEF. Heatstable trypsin from cuttlefish (*Sepia officinalis*) hepatopancreas: purification and characterization. **Food chemistry**, V. 113, p. 146-154. 2009.

BARROS, L.A.; MORAES FILHO, J.; OLIVEIRA, R.L. Larvas de nematóides de importância zoonótica encontradas em traíras (*Hoplias malabaricus* bloch, 1794) no

município de Santo Antonio do Leverger, MT. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.2, p.533-535, 2007.

BENHABILES, M. S.; ABDI, N.; DROUCHE, N.; LOUNICI, H.; PAUSS, A.; GOOSEN, M. F. A. Fish protein hydrolysate production from sardine solid waste by crude pepsin enzymatic hydrolysis in a bioreactor coupled to an ultrafiltration unit. **Material Science and Engineering C**, 32, 922e928, 2012.

BERG, J. M.; STRYER, L.; TYMOCZKO, J.L. Bioquímica. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kooogan, 1104 p, 2004.

BERGOT, P. Structure de l'appareil digestif. II. Structure et fonctions des caeca pyloriques. **In Nutrition des Poissons** (Fontaine, M., ed.), pp. 45–53. Paris, France:Editions du CNRS, 1981.

BESIER, R.B., KAHN, L.P., SARGSION, N.D., VAN WYK, J.A.. Diagnosis, treatment and management of *Haemonchus contortus* in small ruminants. In: Gasser, R., Samson-Himmelstjerna, G.V. (Eds.), *Haemonchus contortus* and Haemonchosis Past, Present and Future Trends. vol. 93, pp. 181-238, 2016.

BESIER, R.B.; KAHN, L.P.; SARGISON, N.D.; VAN WYK, J.A. The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. **Advances in Parasitology**, Volume 93 ISSN 0065-308X, 2016.

BEZERRA, R. S.; LINS, E. J.; ALENCAR, R. B.; PAIVA, P. M.; CHAVES, M. E.; COELHO, L. C.; CARVALHO JR, L. B. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1829-1834, 2005.

BEZERRA, R.S.; SANTOS, J.F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T.S.; COELHO, L. C. B. B.; VIEIRA, V. L. A.; CARVALHO JR., L. B. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from puloric caeca of tambaqui (*colossoma macroporum*). **J. Food Biochem.** 25,199-210, 2001.

BORGERS, M. AND DE NOLLIN, S. (1975). Influence of the anthelmintic mebendazole on microtubules and intracellular organelle movement in nematode intestinal cells. *J. Parasitol.* 60, | 10-122.

BONANTS, P., FITTERS, P., THUIS, H., DEN BELDER, E., WAALWIJK, C., AND HENFLING, J. (1995) A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. *Microbiology* 141, 775–784.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248-254, 1976.

BRITSKI, H. A; SATO, Y; ROSA, A. B. S. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco). 3rd ed. Brasília: **Codevasf** - Câmara dos Deputados, 1988.

BUDDINGTON, R. K.; KROGDHAL, A.; BAKKE-MCKELLEP, A. M. The intestines of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. **Acta Physiologica Scandinavica** 161 (Suppl. 638), 67–80, 1997.

CANTACESSI, C.; CAMPBELL, B.E.; GASSER, R.B. Key strongylid nematodes of animals — Impact of next-generation transcriptomics on systems biology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, 30, 469–48, 2012.

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

CARVALHO, L. N.; FERNANDES C. H. V.; MOREIRA V. SS. Alimentação de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Osteichthyes, Erythrinidae), no rio Vermelho, Pantanal Sul-Matogrossense. **Rev Bras Zootec**; 4(2): 227-236, 2002.

CEZAR, A.S; CATTO, J.B; BIANCHIN, I. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e Perspectivas. **Cienc Rural**, 38 (7): 20832091, 2008.

CHAGAS, A.C.; KATIKI, L.M.; SILVA, I.C.; GIGLIOTI, R.; ESTEVES, S.N.; OLIVEIRA, M.C.; BARIONIJÚNIOR, W. *Haemonchus contortus*: a multiple-resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. **Parasitology International**, 62, 1-6, 2013.

COLES, G. C. The future of veterinary parasitology. *Vet. Parasitol.* 2001, 98, 31–39.

COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, T. R.; WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 44, n. 1-2, p. 35–44, 1992.

COLES, G.C.; JACKSON, F.; POMROY, W.E.; PRICHARD, R.K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M.A.; VERCRUYSSSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Vet. Parasitol.** 136, 167-185, 2006.

CORRÊA, L. L.; KARLING, L. C.; TAKEMOTO, R. M.; CECCARELLI, P. S.; UETA, M. T. Hematological alterations caused by high intensity of L 3 larvae of *Contraecum* sp Railliet & Henry, 1912 (Nematoda, Anisakidae) in the stomach of *Hoplias malabaricus* in lakes in Pirassununga, São Paulo. *Parasitology research*, v. 112, n. 8, p. 2783-2789, 2013.

COURTENAY JR, W. R.; HENSLEY D. A. Survey of introduced non-native fishes. Introduced exotic fishes in North America: status 1979. **National Fishery Research Laboratory**, U.S. Fish and Wildlife Service, Gainesville, FL, 1979.

DARGIE, J.D.; ALLONBY, E.W. Pathophysiology of single challenge infections of *Haemonchus contortus* (In “Merino sheep: studies on red cell kinetics and the ‘self-cure’ phenomenon”). **Int. J. Parasitol.** 5, 147-157, 1975.

DAVID, L.; EMERY, A.; PETER, W.; HUNT, B.; LEO, F.; LE JAMBRE. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? **International Journal for Parasitology** 46 755–769, 2016.

DAVIS, M. W; BIRNIE, A. J; CHAN, A. C; PAGE, A. P; JORGENS, E. M. A Conserved metalloprotease mediates acedeysis in *caenorhabditis elegans*. **Development**, 131, 6001-6008, 2004.

DOBSON, R.J.; BARNES, E.H. Interaction between *Ostertagia circumcincta* and *Haemonchus contortus* infection in young lambs. **Int. J. Parasitol.** 25, 495–501, 1995.

doi:10.3109/07388551.2014.950550, 2016.

DRUDGE, J.H.; SZANTO, J.; WYANT, Z.N.; ELAM, G. Field studies on parasite control in sheep: comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. **Am. J. Vet. Res.** 25, 1512-1518, 1964.

DUNN, A.M. Veterinary Helminthology, second ed. William Heinemann Medical Books Ltd, pp. 184-185, 1978.

ECHEVARRIA, F.; BORBA, M.F.S.; PINHEIRO, A.C.; WALLER, P.J.; HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. **Vet. Parasitol.** 62, 199-206, 1996.

ECHEVARRIA, F.A.M; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L. Efficacy of some anthelmintics on an ivermectin-resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. **Vet. Parasitol.** 39, 279-284, 1991.

EDDI, C.; CARACOSTANTOGOLO, J.; PEENA, M.; SCHAPIRO, J.; MARANGUNICH, L.; WALLER, P.J.; HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Argentina. **Vet. Parasitol.** 62, 189-197, 1996.

EL-BELTAGY, A.E., EL-ADAWY, T.A., RAHMA, E.H., EL-BEDAWAY, A.A. Purification and characterization of an acidic protease from the viscera of bolti fish (*Tilapia nilotica*). **Food Chemistry** 86 (2004) 33–39.

EL-HADJ, N. A.; HMIDET, N.; GHORBEL-BELLAAJ, O.; FAKHFAKH-ZOUARI, N.; BOUGATEF, A.; NASRI, M. Solvent-stable digestive alkaline proteinases from Striped Seabream (*Lithognathus mormyrus*) viscera: characteristics, application in the deproteinization of shrimp waste, and evaluation in laundry commercial detergents, **Appl. Biochem. Biotechnol.** 164 1096–1110, 2011.

EMBRAPA. Ovinocultura e Caprinocultura Conjuntura econômica, aspectos produtivos de 2017 e perspectivas para 2018. Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos n. 3, julho, 2018.

EMBRAPA. Pesquisa da Pecuária Municipal 2018: análise dos rebanhos caprinos e ovinos. Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos n. 9, outubro, 2019.

EROLDOĞAN, O.T; SUZER, C; TAŞBOZAN, O.; TABAKOĞLU, S. Os efeitos de regimes de restrição de taxa em ciclos em enzimas digestivas de dourada, *Sparus aurata*. **Revista Turca de Pesca e Ciências Aquáticas**, 8 , 49-54, 2008.

FABIYI, J.P. Production losses and control of helminths in ruminants of tropical regions. **Int. J. Parasitol.** 17, 435-442, 1987.

FAO. 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture 2012: Opportunities and Challenges; Food and Agricultural Organization of the United Nation: Rome. 4–7 pp.

FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos:Roma. 224 pp.

FETTERER, R.H.; RHOADS, M.L. A hemolytic factor from *Haemonchus contortus* alters erythrocyte morphology. **Veterinary Parasitology**, 80: 37-45, 1998.

FOWLER, H. W. Os peixes de água doce do Brasil. **Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo** 6, 205–404, 1950.

FRAATZ, M. A.; RÜHL, M.; ZORN, H. Food and feed enzymes. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** 143, 229–256. doi:10.1007/10\_2013\_235, 2014.

GADAH, J. A; WANG, S; BO, G; EHSAN, M; YAN, R; SONG, X; XU, L; XIANG RUI L. Proteomic analysis of the excretory and secretory proteins of *haemochus contortus* (Hc Esp) binding to goat PBMCs in vivo revealed stage-specific binding profiles. **pLos one** 11(7), 2016.

GALVIS, G; MOJICA, J. I; CAMARGO, M. Peces del Catatumbo. Santafe de Bogota DC: **Asociacion Cravo Norte**, 1997.

GAYET, M; M. JÉGU, J; BOCQUENTIN; F. R. NEGRI. New characoids from the upper Cretaceous and Paleocene of Bolivia and the Mio-Pliocene of Brazil: phylogenetic position and paleobiogeographic implications. **Journal of Vertebrate Paleontology**, 23: 28-46, 2003.

Geary, T. G.; Conder, G. A.; Bishop, B. The changing landscape of antiparasitic drug discovery for veterinary medicine. **Trends Parasitol.** 2004, 20, 449–455.

GENIER, H. L. A. Atividade nematicida do fungo *Pleurotus ostreatus* e de suas proteases. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo.

GHALY, A. E.; RAMAKRISHNAN, V. V.; BROOK, M. S.; BUDGE, S. M.; DAVE, D. Fish processing wastes as a potential source of proteins, amino acids and oils: a critical review. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, 5(4), 107-129, 2013.

GILLEARD, J.S. *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. **Parasitology** 140, 1506-1522, 2013.

GILLEARD, J.S. Understanding anthelmintic resistance: the need for genomics and genetics. **Int. J. Parasitol.** 36, 1227-1239, 2006.

GREEN, P.E.; FORSYTH, B.A.; ROWAN, K.J.; PAYNE, G. The isolation of a field strain of *Haemonchus contortus* in Queensland showing multiple anthelmintic resistance. **Aust. Vet. J.** 57, 79-84., 1981.

GUERARD, F.; DECOURCELLE, N.; SABOURIN, C.; FLOCH-LAIZET, C.; LE GREL, L.; LE FLOCH, P.; GOURLAY, F.; LE DELEZIR, R.; JAOUEN, P.; BOURSEAU, P. Recent Developments of Marine Ingredients for Food and Nutraceutical Applications. **Journal Des Sciences Halieutique Et Aquatique**, 2, 21–27, 2010.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; KHAN, S.; CHAUHAN, B. Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 59, 15–32, 2002.

HAYES, M.; FLOWER, D. Bioactive peptides from marine processing byproducts. In B. Hernández-Ledesma & M. Herrero (Eds.), *Bioactive compounds from marine foods: Plant and animal sources* (pp. 57–71). Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd. 2013.

HENSLEY, D. A.; MOODY, D. P. Occurrence and possible establishment of *Hoplias malabaricus* (Characoidei; Erythrinidae) in Florida. **Florida Scientist**, p. 122-128, 1975.

HENSLEY, D.A.; MOODY, D.P. Occurrence and possible establishment of *Hoplias malabaricus* (Characoidei, Erythrinidae) in Florida. **Fla. Sci.** 38, 122–128, 1975.

HERMUCHE, P.M.; SILVA, N.C.; GUIMARÃES, R.F.; CARVALHO JUNIOR, O.A.; GOMES, R.A.T.; PAIVA, S.R.; McMANUS, C.M. Dynamics of sheep production in Brazil using principal components and auto-organization features maps. **Revista Brasileira de Cartografia**, 6: 821- 832, 2012.

HUANG, X. W., ZHAO, N. H., AND ZHANG, K. Q. (2004) Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. **Res. Microbiol.** 155, 811–816.

HUNT, P.W.; KNOX, M.R.; LE JAMBRE, L.F.; MCNALLY, J.; ANDERSON, L.J. Genetic and phenotypic differences between isolates of *Haemonchus contortus* in Australia. **Int. J. Parasitol.** 38, 885–900, 2008.

HUNTER, A .R.; MACKENZIE, G. The pathogenesis of a single challenge dose of *Haemonchus contortus* in lambs under six months of age. **J. Helminthol.** 56, 135-144, 1982.

IBGE. Brasil em números 2005. Rio de Janeiro: IBGE, 2005.

IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal – PPM. 2018. Disponível em: Acesso em: 20. nov. 2019.

IGARASHI, M.; CARVALHO, D.M.G.; BUCCI, F.C.; MIRANDA, Y.; RODRIGUES, Z.M.; ALMEIDA, M.C.F.; PIONA, M.N.M. Efeito do neem (*Azadirachta Indica*) no controle de nematódeos gastrintestinais em ovinos suplementados a pasto no período seco. **Ciências Agrárias**, 34: 301-310, 2013.

IZVEKOVA, G.I.; SOLOVYEV, M.M. Activity of digestive hydrolases of fishes after infection by cestodes, **Usp. Sovrem. Biol.**, vol. 132, no. 6, pp. 601–610, 2012.

JACQUIET, P.; CABARET, J.; THIAM, E.; CHEIKH, D. Host range and the maintenance of *Haemonchus spp.* in an adverse arid climate. **International Journal for Parasitology**, 28:,253-261, 1998.

JEMLI, S.; AYADI-ZOUARI, D.; HLIMA, H. B.; BEJAR, S. Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. **Crit. Rev. Biotechnol.** 36, 246–258, 2014.

JOHNVESLY, B., NAIK, G. R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus s. JB- 99* in a chemically defined medium. **Process Biochemistry**, 44, 37-138, 2001.

JUNWEI, W., QINGLING M, JUN Q, WEISHENG W, SHUANGQING C, JIANXUN L, et al. The recombinant serine protease XAoz1 of *Arthrobotrys oligospora* exhibits potent nematicidal activity against *Caenorhabditis elegans* and *Haemonchus contortus*. **FEMS Microbiol. Lett.** 2013; 344: 53-59.

KARIM, A. A.; BHAT, R. Fish gelatin: Properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, 23(3), 563–576, 2009.

KISHIMURA, H.; KLOMBLAO, S.; BENJAKUL, S.; CHUN, B. Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleyes Pollock *Theragra chalcogramma*. **Food chemistry**, v. 106, p. 194-199, 2008.

KISHIMURA, H.; TOKUDA, Y.; YABE, M.; KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; ANDO, S. Trypsins from the pyloric ceca of jacobever (*Sebastes schlegelii*) and elkhorn sculpin (*Alcichthys alcicornis*): Isolation and characterization. **Food chemistry**, v.100, p. 140-1495, 2007.

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H.; E SIMPSON, B.K. Purification and characterization of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). **Food chemistry**, 100, 1580-1589, 2007.

KLOMKLAO, S.; KISHIMURA, H.; NONAMI, Y.; BENJAKUL, S. Biochemical properties of two isoforms of trypsin purified from the intestine of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). **Food Chem.** 115, 155-162, 2009.

KOFUJI, P.Y.M., AKIMOTO, A., HOSOKAWA, H., AND MASUMOTO, T., Seasonal changes I proteolytic enzymes of yellowtail *Seriola quinqueradiata* (Temminck & Schlegel; Carangidae) fed extruded diets containing different protein and energy levels, **Aquacult. Res.**, vol. 36, pp. 696–703, 2005.

KOTZE, A.C., PRICHARD, R.K. Anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*: history, mechanisms and diagnosis. In: Gasser, R., Samson-Himmelstjerna, G.V. (Eds.),

*Haemonchus contortus* and Haemonchosis Past, **Present and Future Trends**. vol. 93, pp. 397- 428, 2016.

KOTZE, A.C.; PRICHARDX, R.K. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. **Advances in Parasitology**, Volume 93, 2016.

KTARI, N.; KHALED, B.H.; NASRI, R.; JELLOULI, K.; GHORBEL, S.; NASRI, M. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: purification, characterization and potential application as a detergent additive. **Food Chem.** 130, 467-474, 2012.

KUBITZA, F. Nutrição e alimentação dos peixes cultivados, 3rd edn. Jundiaí/SP Piracicaba: **Degapari Ltda**, 1999.

KUZ'MINA, V.V. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts, **Aquaculture**, vol. 148, pp. 25–37, 1996.

KUZ'MINA, V.V.; STREL'NIKOVA, A.P. Influence of diurnal rhythms of feeding during intestine total amylolytic activity and activity of alkaline phosphatase in juvenile fish, **Inland Water Biol.**, vol. 1, no. 2, pp. 182–191, 2008.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v.226, p. 680-685, 1970.

LACEY, E. Mode of Action of Benzimidazoles. *Parasitology Today*, vol. 6, no. 4, 1990.

LASSOUED, I.; HAJJI, S.; MHAMDI, S.; JRIDI, M.; BAYOUDH, A.; BARKIA, A.; NASRI, M. Digestive alkaline proteases from thornback ray (*Raja clavata*): Characteristics and applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 80, p. 668-675, 2015.

LAZO, J. P; MENDOZA, R; HOLT, G. J; AGUILERA, C; ARNOLD, C. R. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Aquaculture** 265(1-4): 194-205, 2007.

LE JAMBRE, L.F. Ivermectin-resistant *Haemonchus contortus* in Australia. **Aust. Vet. J.** 70, 357, 1993.

LE JAMBRE, L.F.; WHITLOCK, J.H. Changes in the hatch rate of *Haemonchus contortus* eggs between geographic regions. **Parasitology** 73, 223-238, 1976.

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

LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J.; KELLEN, R. A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Biology**, 76, 103-122, 1973.

LEVINE, N.D. Nematode Parasites of Domestic Animals and of Man, second ed. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 1980.

LIANG L, MENG Z, YE F, YANG J, LIU S, SUN Y, et al. The crystal structures of two cuticle-degrading proteases from nematophagous fungi and their contribution to infection against nematodes. *FASEB J.* 2010; 24: 1391- 1400.

LIMA, M. C. B. C.; LIRA, R. D.; BARROS, N. H. C.; SILVA, W. N.; CHELLAPPA, C. Biologiareprodutiva do peixe traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Characiformes: Erythrinidae) no açude Marechal Dutra, Rio Grande do Norte, Brasil. *Periódicos UNIFAP.* 2017.

LOUREIRO, V. E; HAHN N. S. Dieta e atividade alimentar da traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Osteichthyes, Erythrinidae), nos primeiros anos de formação do Reservatório de Segredo - PR. *Acta Limnol Bras;* 8: 195-205, 1996.

LOVE, S.C.J.; NEILSON, F.J.A.; BIDDLE, A.J.; MCKINNON, R. Moxidectin resistant *Haemonchus contortus* in sheep in northern New South Wales. *Aust. Vet. J.* 81, 359-360, 2003.

MACIEL, S.; GIMÉNEZ, A.M.; GAONA, C.; WALLER, P.J.; HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Paraguay. *Vet. Parasitol.* 62, 207-212, 1996.

MANDUJANO-GONZÁLEZ, V. Secreted fungal aspartic proteases: a review. *Revista iberoamericana de micología*, v.33; n.2, p. 76-82, 4. ISSN 1130- 1406, 2016.

MANSFIELD, L. S.S.; GAMBLE, H.R.; FETTER, R. H. Characterization of the egg shell of *Haemonchus contortus*. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, v. 103, n. 3, p. 681-686, 1992.

MARANHÃO, R.L.A. Dinâmica da produção de ovinos no Brasil durante o período de 1976 a 2010. Monografia de final de curso, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Humanas, Departamento de Geografia, Brasília, 42p. 2013.

MARCUSCHI, M; ESPÓSITO, T. S.; MACHADO, M. F.; HIRATA, I. Y.; MACHADO, M. F.; SILVA, M. V.; BEZERRA, R. S. Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macroporum*). *Biochemical and biophysical research communications*, v. 396, n. 3, 667-673, 2010.

MARIAM, S. S.; OOI, C. W.; TAN, W. S.; JANNA, O. A.; ARBAKARIYA, A.; TEY, B. T. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G with ammonium sulphate precipitation and mixed-mode chromatography. *Separation and purification technology*, v.144, p.133-138, 2015.

MARTIN, P. Beyond the next generation of therapeutic proteins. *Biotech international*, 2006.

MARTÍNEZ-ALVAREZ, O; CHAMORRO, S.; BRENES, A. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. *Food Research International*, 73, 204–212, 2015.

MC KELLAR, Q. A.; SCOTT, E. W. The benzimidazole anthelmintic agents. A review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1990, 13, 223–247.

MCLEOD, R.S. Economic impact of worm infections in small ruminants in South East Asia, India and Australia. In: Sani, R.A., Gray, G.D., Baker, R.L. (Eds.), *Worm Control of Small Ruminants in Tropical Asia*, ACIAR Monograph, 113, pp. 23-33, 2004.

MELO, A. C. F. L.; REIS, I. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; VIEIRA, L. S.; ECHEVARRIA, F. A. M.; MELO, L. M. Nematódeos resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 339-344. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782003000200024>, 2003.

MESCHIATTI, A. J.; ARCIFA, M. S. Early life stages of fish and the relationships with zooplankton in a tropical Brazilian reservoir: lake Monte Alegre. **Brazilian Journal of Biology** 62, 41–50, 2002.

MORAES, M. F. P. G; BARBOLA, I. F. Hábito alimentar e morfologia do tubo digestivo de *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) da Lagoa Dourada, Ponta Grossa, Paraná, Brazil. **Acta Biol. Par.**, 24 (1,2,3,4): 1-23. 1995.

MURASHITA, K; MATSUNARI, H; KUMON, K; TANAKA, Y; SHIOZAWA, S; FURUITA, H; OKU, H; YAMAMOTO, T. Characterization and ontogenetic development of digestive enzymes in Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* larvae. **Fish Physiology and Biochemistry** 40(6), 2014.

NARI, A.; SALLES, J.; GIL, A.; WALLER, P.J.; HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Uruguay. **Vet. Parasitol.** 62, 213-222, 1996.

NELSON, David L.; COX, Michael M. *Lehninger: principios de bioquímica*. 2015.

O'CONNOR, L.J., WALKDEN-BROWN, S.W., KAHN, L.P. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. **Vet. Parasitol.** 42, 1-15, 2006.

O'CONNOR, L.J.; WALKDEN-BROWN, S.W.; KAHN, L.P. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. **Vet. Parasitol.** 42, 1-15, 2006.

OKADA, E. K., A. A; AGOSTINHO, M; PETRERE JR; T. PENCZAK. Factors affecting fish diversity and abundance in drying ponds and lagoons in the upper Paraná River basin, Brazil. **Ecohydrology and Hydrobiology**, 3(1): 97-110, 2003.

OLIVEROS, O. B; ROSSI, L. M. Ecologia trófica de *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). **Revista de la Asociacion de Ciencias Naturales del Litoral** 22, 55–68, 1991.

OYAKAMA, O.T. Family Erythrinidae. In: Reis, R. E; Kullander, S.O & Ferraris Jr, C. J. (Eds). *Check list of the fresh water fishes of south American*. Porto Alegre: Adipurs. 2003.

OYAKAWA, O. T; AKAMA, A; MAUTARI, K. C, NOLASCO, J. C. Peixes de Riachos da Mata Atlântica: nas unidades de conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo. São Paulo: **Neotropica**, 2006.

OYAKAWA, O. T; G. M. T. MATTOX. Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species. **Neotropical Ichthyology**, 7(2): 117-140, 2009.

OYAKAWA, O.T. 2003. Family Erythrinidae. In Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (R. Reis, S. Kullander & C. Ferraris, eds.). EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 238-240.

PACHECO, J. G. Fauna parasitária em traíras (*Hoplias malabaricus*): Represa II do Campus Universitário I “Fontes do Saber”. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de Rio Verde.

PAGE, A. P; STEPEK, G; WINTER, A. D; PERTAB, D. Enzymology of the nematode cuticle: A potencial drug target? **International for parasitology: Drugs and drugs resistences** 4, 133-141, 2014.

PAIVA, M. P. Crescimento, alimentação e reprodução da traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch) no Nordeste brasileiro. São Paulo, 32 p. (Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo).1974.

PERRY, B.D.; RANDOLPH, R.F.; MCDERMOTT, J.J.; SONES, K.R.; THORNTON, P.K. Investing in Animal Health Research to Alleviate Poverty. **International Livestock Research Institute (ILRI)**, Nairobi, Kenya, 148 pp, 2002.

POESCHEL, G.P.; TODD, A.C. Selection for variations in pathogenicity of *Haemonchus contortus* isolates. **Am. J. Vet. Res.** 33, 1575–1582, 1972a.

PUENTE, X. S., SANCHEZ, L. M., OVERALL, C. M. & LOPEZ-OTIN, C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. **Nature Rev. Genet.** v.4, pg 544–558, 2003.

PUJANTE, I. M.; DÍAZ-LÓPEZ, M.; MANCERA, J. M.; MOYANO, F. J. Characterization of digestive enzymes protease and alpha-amylase activities in the thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*, Risso 1827). **Aquaculture research**, v. 48, n. 2, p. 367-376, 2017.

QAMAR, M.F.; MAQBOOL, A.; AHMAD, N. Economic losses due to haemonchosis in sheep and goats. **Sci. Int.** 24, 321-324, 2012.

RAI, A. K.; SWAPNA, H. C.; BHASKAR, N.; HALAMI, P. M.; SACHINDRA, N. M. Effect of fermentation ensilaging on recovery of oil from fresh water fish viscera. **Enzyme and Microbial Technology**, 46(1), 9–13, 2010.

RANTIN, F. T., A. L.; KALININ, M. L. GLASS; M. N. FERNANDES. Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life of two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*). **Journal of Fish Biology**, 41: 805-812, 1992.

RANTIN, F. T., M. L. GLASS, A. L.; KALININ, R. M. M; VERZOLA & M. N. FERNANDES. Cardio-respiratory responses in two ecologically distinct erythrinids

(*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. **Environmental Biology of Fishes**, 36: 93-97, 1993.

RAO, M. B et al. molecular and biotechnological aspects of microbial protease. **Microbiology and molecular biology reviews**, v.62, n3, p.597-635. ISSN 1092-2172, 1998.

REINECKE, R.K.; BRUCKNER, C.; DE VILLIERS, I.L. Studies on *Haemonchus contortus*. IV. The effect of *Trichostrongylus axei* and *Ostertagia circumcincta* on challenge with *H. contortus*. **Onderstepoort J. Vet. Res.** 48, 229–234, 1981.

REIS, R. E; KULLANDER, S. O; FERRARIS, C. J. The Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: **EDIPUCRS**, 2003.

RIOS, F. S; KALININ, A. L; RANTIN; F. T. The effects of long term food deprivation on respiration and hematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Journal of Fish Biology**, 61: 85-95, 2002.

RIOS, F.S; OBA, E.T; FERNANDES, M.N; KALININ, A.L; RANTIN, F.T. Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in the neotropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Comp. Biochem. Physiol.** 140 (Part A), 281–287, 2005.

Robertson, A. P., Bjorn, H. E. and Martin, R. J. (1999). Resistance to levamisole resolved at the single-channel level. **FASEB Journal** 13, 749–760.

Robertson, A. P., Clark, C. L., Burns, T. A., Thompson, D. P., Geary, T. G., Trailovic, S. M. and Martin, R. J. (2002). Paraherquamide and 2-deoxy-paraherquamide distinguish cholinergic receptor subtypes in *Ascaris* muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 302, 853–860.

RODITAKIS E, RODITAKE N, TSAGKARAKOU A. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete. **Pest Manag Sci** 61:577–582, 2005.

ROGERS, W. P.; BROOKS, F. The mechanism of hatching of eggs of *haemonchus contortus*. **International journal of parasitology**, 17, 61-65, 1977.

ROSE, H.; HOAR, B.; KUTZ, S.J.; MORGAN, E.R. Exploiting parallels between livestock and wildlife: predicting the impact of climate change on gastrointestinal nematodes in ruminants. **Int. J. Parasitol.** PAW. 3, 209–219, 2014.

SANTOS, C. W. V. Purificação e caracterização de tripsina a partir do ceco pilórico do pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). Dissertação de mestrado. Pós-graduação em química e biotecnologia da universidade de Alagoas. 2016.

SARANYA, R.; PRASANNA, R.; JAYAPRIYA, J.; ARAVINDHAN, R.; SELVI, A. T. Value addition of fish waste in the leather industry for dehairing. **Journal of cleaner production**, v. 118, p. 179-186, 2016.

SHAHIDI, F.; KAMIL, J. Y. V. A. Enzymes from Fish and Aquatic Invertebrates and Their Application in the Food Industry. **Trends in Food Science and Technology**, 12, 435–464, 2001.

SHI, C; MARSHALL, S. N; SIMPSON, B. K. Purification and characterization of trypsin from the pyloric ceca of the new Zealand Hoki fish (*Macruronus Novaezealandiae*). **Journal of food biochemistry**, v.31, n.6, p772-796, 2007.

SILVERMAN, P.H.; PATTERSON, J.E. Histoprotrophic (parasitic) stages of *Haemonchus contortus*. **Nature** 185, 54-55, 1960.

SIMPSON, B. K. Digestive Proteinases from Marine Animals. In *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*. Eds.; **Marcel Dekker: New York**, 531–540, 2000.

SOARES, F.E.F.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; GENIÊR, H.L.A.; GOUVEIA, A.S.; QUEIROZ, J.H. Nematicidal activity of three novel extracellular proteases of the nematophagous fungus *Monacrosporium sinense*. **Parasitology Research**, v. 112, p. 1557-65, 2013.

SOUZA, C. B. D. Isolamento e caracterização da tripsina do ceco pilórico da espécie *Scomberomorus brasiliensis* (Serra). 2018.

SOUZA, P. M. D. A biotechnology perspective of fungal protease. **Brasillian journal of microbiology**, n. 46, n.2, p. 337- 345. ISSN 1517- 8382, 2015.

STEPEK, G; MC CORMACK, G; BIRNIE, A. J; PAGE, A. P. The astacin metalloprotease moulting enzyme NAS- 36 is required for normal cuticle ecdysis in free-living and parasitic nematodes. **Parasitology** 138: 237-248, 2011.

TAPHORN, D. C. The characiform fishes of the Apure River drainage, Venezuela. *BioLlania* (Guanare, Venezuela), special edition 4, p.537,1992.

TRAILOVIC, S. M., CLARK, C. L., ROBERTSON, A. P. AND MARTIN, R. J. (2005). Brief application of AF2 produces long lasting potentiation of nAChR responses in *Ascaris suum*. **Molecular and Biochemical Parasitology** 139, 51–64.

TRAILOVIC, S. M., ROBERTSON, A. P., CLARK, C. L. AND MARTIN, R. J. (2002). Levamisole receptor phosphorylation: effects of kinase antagonists on membrane potential responses in *Ascaris suum* suggest that CaM kinase and tyrosine kinase regulate sensitivity to levamisole. **Journal of Experimental Biology** 205, 3979–3988.

TROELL, K.; ENGSTROM, A.; MORRISON, D.A.; MATTSSON, J.G.; HOGLUND, J. Global patterns reveal strong population structure in *Haemonchus contortus*, a nematode parasite of domesticated ruminants. **Int. J. Parasitol.** 36, 1305–1316, 2006.

TURNER, J.H.; KATES, K.C.; WILSON, G.I. The interaction of concurrent infections of the abomasal nematodes, *Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus axei* (Trichostrongylidae) in lambs. **Proc. Helminth. Soc. Washington** 20, 210–216, 1962.

UGOLEV, A.M.; KUZ'MINA, V.V. Pishchevaritel'nye protsessy i adaptatsii u ryb (Digestion and Adaption in Fishes), St. Petersburg: Gidrometeoizdat, 1993.

URQUHART, G.M., ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.M. **Veterinary Parasitology**, second ed. Blackwell Science, pp. 19-21, 1996.

VAN WYK, J.A.; GERBER, H.M. A field strain of *Haemonchus contortus* showing slight resistance to rafoxanide. **Onderstepoort J. Vet. Res.** 47, 137-142, 1980.

VAN WYK, J.A.; GERBER, H.M.; ALVES, R.M. Slight resistance to the residual effect of closantel in a field strain of *Haemonchus contortus* which showed an increased resistance after one selection in the laboratory. **Onderstepoort J. Vet. Res.** 49, 257-261, 1982.

VAN WYK, J.A.; MALAN, F.S. Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxanide and the benzimidazoles in South Africa. **Vet. Rec.** 123, 226-228, 1988.

VAN WYK, J.A.; MALAN, F.S.; GERBER, H.M.; ALVES, R.M.R. The problem of escalating resistance of *Haemonchus contortus* to the modern anthelmintics in South Africa. **Onderstepoort J. Vet. Res.** 56, 41-49, 1989.

VAN WYK, J.A.; MALAN, F.S.; RANGLES, J.L. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? **Vet. Parasitol.** 70, 111-122, 1997.

VAN WYK, J.A.; STENSON, M.O.; VAN DER MERWE, J.S.; VORSTER, R.J.; VILJOEN, P.G. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. **Onderstepoort J. Vet. Res.** 66, 273-284, 1999.

VANNABUN, A.; RAWDKUEN, S. Aqueous two-phase partitioning of alkaline protease from viscera of farmed Giant Catfish. In: **Proceedings of the 4th International Conference on Natural Products for Health and Beauty**. Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand, 2012.

VATTA, A.F.; LINDBERG, A.L.E. Managing anthelmintic resistance in small ruminant livestock of resource-poor farmers in South Africa, 0038-2809 **J. S. Afr. Vet. Assoc.** 77, 2-8, 2006.

WALLER, P.J., CHANDRAWATHANI, P. *Haemonchus contortus*: parasite problem No. 1 from tropics to polar circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. **Trop. Biomed.** 22, 131-137, 2005.

WOOSTER, M.J.; WOODGATE, R.G.; CHICK, B.F. Reduced efficacy of ivermectin, abamectin and moxidectin against field isolates of *Haemonchus contortus*. **Aust. Vet. J.** 79, 840-842, 2001.

ZHOU, L.; BUDGE, S.M.; GHALY, A.E.; BROOKS, M.S.; DAVE, D. Extraction, purification and characterization of fish chymotrypsin: a review. **Am. J. Biochem. Biotechnol.** 7, 104-123, 20.