



LUCAS NOGUEIRA DE SIQUEIRA

**EFEITO DO USO DO LÁTEX DE MAMÃO E DA PAPAÍNA
PURA NO CONTROLE DE OOCISTOS DE *Eimeria bovis***

LAVRAS, MINAS GERAIS

2023

LUCAS NOGUEIRA DE SIQUEIRA

**EFEITO DO USO DO LÁTEX DE MAMÃO E DA PAPAÍNA PURA NO
CONTROLE DE OOCISTOS DE *Eimeria bovis***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Lavras, como parte das
exigências do curso de Licenciatura em Química,
para a obtenção do título de licenciado.

Prof. Dr. Filippe Elias de Freitas Soares
Orientador

LAVRAS, MINAS GERAIS

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida, por sempre me dar forças para continuar, por tantas graças alcançadas durante este curso, por cada batalha vencida, e por todas as pessoas que Ele foi colocando na minha vida ao longo desta trajetória.

Aos meus pais, por proporcionarem a mim e aos meus irmãos a oportunidade de estudar, por sempre me apoiarem, me incentivando a seguir em frente, a enfrentar os desafios sem desistir.

Aos meus irmãos, pela grande amizade e pelo constante apoio que sempre me deram.

A todos os professores que fizeram parte desta importante etapa da minha vida, possibilitando a realização deste grande objetivo, de modo especial ao meu orientador, o professor Filipe, quem muito me ajudou na construção deste trabalho.

À todas as meninas do laboratório de bioquímica que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, de modo especial Ruth e Lisseth, com as quais eu pude aprender muitas coisas, como por exemplo a usar o microscópio e a falar um pouco de espanhol, além de muito colaborarem com a realização deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos, por toda amizade e companheirismo durante todo o curso.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela grande oportunidade que me concederam.

“O talento nos é dado pelo Criador e só permanece se aquele que o recebe se mantém na humildade, no reconhecimento de que a criação sempre é divina, e não humana.”

(José Augusto Nasser)

RESUMO

A eimeriose é uma doença causada pelo protozoário do filo Apicomplexa, do gênero *Eimeria*. Esta doença ataca o sistema gastrointestinal principalmente de bovinos, ovinos e caprinos em idade mais jovem, podendo atacar também os animais mais adultos onde o manejo é praticado de forma incorreta. Os principais sintomas causados são diarreia com a presença de sangue, anorexia, desidratação e alta mortalidade, o que causa prejuízos econômicos expressivos para os criadores e para a pecuária brasileira. O ciclo de vida da *Eimeria* passa pela fase de oocistos não esporulados e esporulados (infectantes). Uma importante característica desses oocistos é que a sua membrana externa é formada por carboidratos, lipídeos e proteínas. Em contrapartida, sabemos que o látex do mamão, além de possuir várias outras substâncias, é rico em enzimas, das quais se destaca a papaína. Diante de tudo isso, o objetivo deste trabalho é avaliar a capacidade que o látex de mamão e a papaína pura possuem para romper os oocistos esporulados e não esporulados de *Eimeria bovis*, causando a interrupção do seu ciclo de vida. Os oocistos foram avaliados por contagem ao microscópio e comparação estatística por meio do teste de Tukey e teste t com a quantidade controle para avaliar se houve redução significativa no número de oocistos presentes na amostra. Todos os testes feitos causaram alguma redução no número de oocistos em relação aos seus respectivos controles, no entanto apenas o tratamento feito com solução de látex à 30% se diferenciou estatisticamente dos demais.

Palavras-chave: *Eimeria bovis*, oocistos, látex, papaína, proteases.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE LATICÍFEROS ARTICULADOS (A) DE AMOREIRA (<i>MORUS SP.</i>) E NÃO-ARTICULADOS (B) DE ESPIRRADEIRA (<i>NERIUM OLEANDER</i>).....	9
FIGURA 2 - REAÇÃO ENZIMÁTICA SIMPLES.....	10
FIGURA 3 - ESTRUTURA DA PAPAÍNA (PDB ID: 9PAP), KAMPHUIS ET AL., 1984. OS RESÍDUOS CYS-25 (AZUL) E GLN-19 (VERDE) SE ENCONTRAM EM UM DOMÍNIO, JÁ OS RESÍDUOS HIS-159 (VERMELHO) E ASN-175 (AMARELO), ESTÃO NO DOMÍNIO OPOSTO AO DA CYS-25.	12
FIGURA 4 - CICLO DE VIDA DA <i>EIMERIA SP.</i>	14
FIGURA 5 - PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DA UFMG, CONTENDO OOCISTOS DE <i>EIMERIA BOVIS</i> EM SOLUÇÃO DE DICROMATO DE POTÁSSIO, APÓS SUCESSIVAS CENTRIFUGAÇÕES E LAVAGENS COM ÁGUA DESTILADA, ESTANDO A AMOSTRA ORIGINAL À ESQUERDA E A PURIFICADA À DIREITA.	18
FIGURA 6 - CONCENTRAÇÃO DOS OOCISTOS PELO MÉTODO DE FLUTUAÇÃO DE WILLIS.	19
FIGURA 7 - SOLUÇÕES PARA A MONTAGEM DOS TESTES COM CONCENTRAÇÃO DE 30%, SENDO DA ESQUERDA PARA A DIREITA: PAPAÍNA PURA, LÁTEX DE MAMOEIRO E LÁTEX DE MAMOEIRO DESNATURADO.	19
FIGURA 8 - OOCISTOS DE <i>EIMERIA BOVIS</i> NA SOLUÇÃO CONTROLE (ÁGUA DESTILADA), INDICADOS PELAS SETAS, SENDO ESPORULADO À ESQUERDA E NÃO ESPORULADO À DIREITA.	20
FIGURA 9 - MONTAGEM DO TESTE COM 6 REPETIÇÕES PARA CADA SOLUÇÃO (TRATAMENTO) E PARA O CONTROLE FEITO COM ÁGUA DESTILADA, SENDO DE CIMA PARA BAIXO: CONTROLE, LÁTEX DE MAMOEIRO, PAPAÍNA PURA E LÁTEX DE MAMOEIRO DESNATURADO.....	21
FIGURA 10 - PERCENTUAL DE REDUÇÃO DO NÚMERO DE OOCISTOS DE <i>EIMERIA BOVIS</i> , EM RELAÇÃO AO CONTROLE, PARA OS TRATAMENTOS COM LÁTEX DE MAMOEIRO, PAPAÍNA PURA E LÁTEX DE MAMOEIRO DESNATURADO, À 10% DURANTE 48 HORAS.....	22
FIGURA 11 - PERCENTUAL DE REDUÇÃO DO NÚMERO DE OOCISTOS DE <i>EIMERIA BOVIS</i> , EM RELAÇÃO AO CONTROLE, PARA OS TRATAMENTOS COM LÁTEX DE MAMOEIRO, PAPAÍNA PURA E LÁTEX DE MAMOEIRO DESNATURADO, À 15% DURANTE 48 HORAS.....	22
FIGURA 12 - PERCENTUAL DE REDUÇÃO DO NÚMERO DE OOCISTOS DE <i>EIMERIA BOVIS</i> , EM RELAÇÃO AO CONTROLE, PARA OS TRATAMENTOS COM LÁTEX DE MAMOEIRO, PAPAÍNA PURA E LÁTEX DE MAMOEIRO DESNATURADO, À 30% DURANTE 48 HORAS.....	23

FIGURA 13 - EXEMPLOS DE OOCISTOS DE E. BOVIS APÓS SOFREREM DIGESTÃO PELAS SOLUÇÕES TRATAMENTO. ESTANDO EM LÁTEX DE MAMOEIRO 10% (I), LÁTEX DE MAMOEIRO DESNATURADO 15% (II), PAPAÍNA PURA 30% (III) E LÁTEX DE MAMOEIRO DESNATURADO 25% (IV).24

Sumário

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVO	8
3. REFERENCIAL TEÓRICO	8
3.1 Mamão e látex	8
3.2 Enzimas, Proteases e Papaína	9
3.3 Eimeriose	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 Parte experimental	15
4.1.1 Extração e obtenção dos oocistos	15
4.1.2 Purificação das amostras	16
4.1.3 Preparação das soluções e montagem dos testes	16
4.2 Contagem dos oocistos e análise estatística	17
5. RESULTADOS	18
6. DISCUSSÃO	24
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. INTRODUÇÃO

A pecuária é uma das principais atividades econômicas do Brasil, correspondendo à cerca de 30% do produto interno bruto (PIB) (AGE/MAPA, 2014). De acordo com o Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (SENAR, 2011), esse setor vem se destacando como um contribuinte eficaz no crescimento da produção de alimentos no Brasil.

Dentre os vários segmentos da pecuária no Brasil, segundo o Ministério da Agricultura (2023), a bovinocultura está na posição de destaque como uma das principais facetas do agronegócio brasileiro no cenário internacional. Possuindo o segundo maior rebanho do mundo, a Índia ocupa a primeira posição, o Brasil assumiu no ano de 2004 a dianteira das exportações, sendo responsável por 20% de toda carne bovina comercializada mundialmente. E além da produção de carne bovina, o Brasil se destaca também como um grande produtor de leite, ocupando a terceira posição no ranking mundial, estando atrás apenas de Estados Unidos e Índia (ROCHA; CARVALHO; RESENDE, 2020).

No entanto, para que a produção de carne bovina e de leite tenham êxito, é de extrema importância a prática de manejos adequados em todas as etapas do ciclo produtivo, onde se deve estar sempre atento às necessidades nutricionais e principalmente sanitárias dos animais (GOMES, 2018). Sabe-se que pelo menos 5% do rebanho bovino no Brasil morre a cada ano por causas diversas (Pessoa et al. 2013), sendo que por meio de um estudo realizado no sul do país, notou-se que infecções associadas a doenças inflamatórias e parasitárias são responsáveis por cerca de 77% de tais mortes (Lucena et al. 2010).

Grande parte dos rebanhos no Brasil ainda são criados a base de pasto, o chamado regime extensivo, que juntamente com o clima acaba contribuindo para a ocorrência de infecções por parasitas gastrointestinais. Dentre esses parasitas, os mais comumente encontrados são os helmintos gastrointestinais, nematoides causadores das helmintoses, e os coccídeos, protozoários apicomplexos responsáveis por causar a coccidiose (FONSECA et al; 2023).

A coccidiose pode ser caracterizada por quadros de alterações gastrointestinais, como diarreia ou presença de sangue nas fezes do animal contaminado. É também chamada de Eimeriose, pois os protozoários causadores são do gênero *Eimeria*. Essa doença infecciosa vem causando um impacto de ordem econômica cada vez maior na pecuária brasileira (FONSECA et al; 2023). A taxa de mortalidade e o baixo desempenho dos animais colocam essa patologia entre as principais causas de prejuízos na bovinocultura. As espécies mais relevantes que afetam bovinos são *Eimeria bovis*, *Eimeria zuernii* e *Eimeria alabamensis*, sendo que as duas

primeiras são mais incidentes no Brasil e a última no território europeu (FONSECA et al; 2023).

Diante da grande importância econômica que essa enfermidade apresenta, é de extrema importância a pesquisa e o desenvolvimento de novos métodos e substâncias para seu controle e erradicação.

2. OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo avaliar o efeito do látex de mamão (*Carica papaya*) e da papaína pura sobre oocistos esporulados e não esporulados de *Eimeria bovis*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

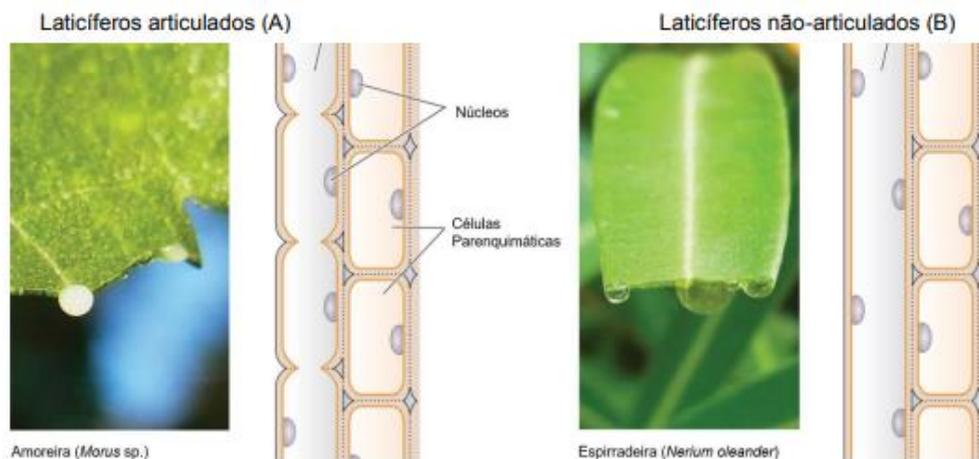
3.1 Mamão e látex

Carica papaya, planta conhecida popularmente como mamoeiro, é uma espécie cultivada em larga escala em regiões subtropicais e tropicais, esta é uma espécie de comportamento semiperene e que pertence à família Caricaceae (BORELLA & STEVANATO, 2015). De acordo com Faostat (2015), o mamoeiro se destaca como uma das frutíferas mais cultivadas e consumidas dessas regiões do globo terrestre. Sendo seus maiores produtores mundiais a Índia, Brasil, Indonésia, Nigéria e México, sendo a produção brasileira correspondente a 12,6% da produção mundial.

Seus frutos, popularmente chamados de mamão ou papaia, carnosos e indeiscentes, cuja polpa é macia e de coloração amarelo-avermelhado, são amplamente utilizados na alimentação, pois são ótimas fontes de cálcio, vitamina A e C (Silva et al., 2015). Porém, estes frutos quando ainda verdes, são ótimos produtores de látex, que é veiculado através de vasos laticíferos que se estendem por todo o fruto e uma de suas funções é ser utilizado pela planta como um mecanismo para sua defesa contra animais e insetos agressores, devido a sua intensa atividade proteolítica (Macalood et al., 2014).

As células laticíferas são alongadas e especializadas na secreção de látex, estando presentes por toda a planta. Estas células formam os vasos laticíferos que podem ser articulados, neste caso as células estão enfileiradas, ou não articulados, onde as células são isoladas e cujo crescimento é indeterminado (MARQUES, 2017), como mostrado na Figura 1. Segundo Macalood et al. (2014) o mamoeiro possui vasos laticíferos do tipo articulado.

Figura 1 - Representação esquemática de laticíferos articulados (A) de Amoreira (*Morus sp.*) e não-articulados (B) de Espirradeira (*Nerium oleander*).



Fonte: Tais (2008).

Plantas tropicais apresentam com uma maior frequência a presença de látex quando comparadas com as plantas das demais regiões. Isso se dá devido a maior quantidade de insetos presentes nessas localidades, o que faz com que as plantas sejam mais atacadas e esse fato corrobora com o uso do látex pela planta como mecanismo de defesa. O látex é liberado no exato local onde ocorreu algum tipo de dano nos tecidos do vegetal, carreando substâncias de defesa que isolam o local afetado, atuando como agente selante nas regiões danificadas, graças a sua capacidade de rápida coagulação, o que impede a entrada de possíveis patógenos (MUSIDLAK et al, 2020).

A ação prejudicial do látex contra os insetos é desempenhada em grande parte por proteínas, sendo a papaína a de maior destaque no látex de mamoeiro, que é formado por até 30% de enzimas proteolíticas (Lavanya et al., 2018). A papaína possui atividade de cisteína-protease, atuando com grande importância na defesa do mamoeiro (Amri and Mamboya, 2012).

3.2 Enzimas, Proteases e Papaína

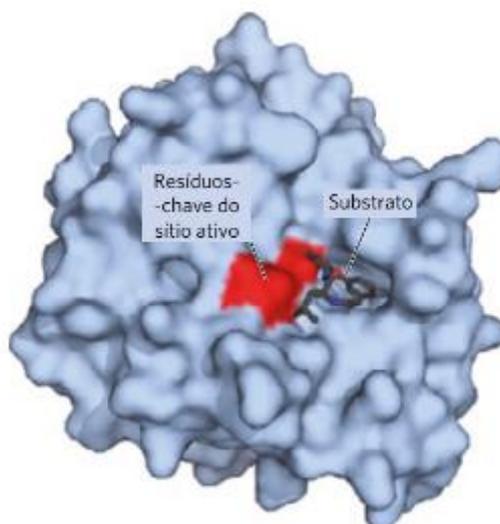
Existe uma classe de proteínas que possui uma função específica, a capacidade de catalisar reações bioquímicas, à essa classe dá-se o nome de enzimas (ALTINKAYNAK; TAVLASOGLU; OCSOY, 2016). O nome enzima foi dado a esse grupo de proteínas por Frederick W. Kühne, termo que vem do grego *enzymos* e que significa “levedado”. As enzimas possuem peso molecular que pode variar de 12000 Daltons a mais de um milhão, dependendo da molécula, assim como as demais proteínas (NELSON; COX, 2019).

A capacidade das enzimas de realizar a catálise nas reações bioquímicas é de extrema importância para os seres vivos, pois em condições biológicas normais essas reações, quando

não catalisadas, se processam em velocidades muito baixas, o que não permitiria a manutenção das atividades básicas dos organismos. A catálise enzimática ocorre porque a enzima é capaz de criar um ambiente adequado, possibilitando que aquela reação específica se desenvolva com maior velocidade. Este ambiente adequado é denominado sítio ativo e a molécula sobre a qual a enzima age é chamada de substrato (NELSON; COX, 2019).

O sítio ativo possui na sua superfície resíduos de aminoácidos com várias cadeias laterais, são essas terminações que se ligam a molécula de substrato para catalisar sua transformação bioquímica, como mostrado na Figura 2. A enzima constantemente captura moléculas do substrato que estão na solução, formando o complexo enzima-substrato que é o epicentro da ação enzimática (NELSON; COX, 2019).

Figura 2 - Reação enzimática simples.



Fonte: Princípios de Bioquímica de Lehninger 7^oed. pág. 190.

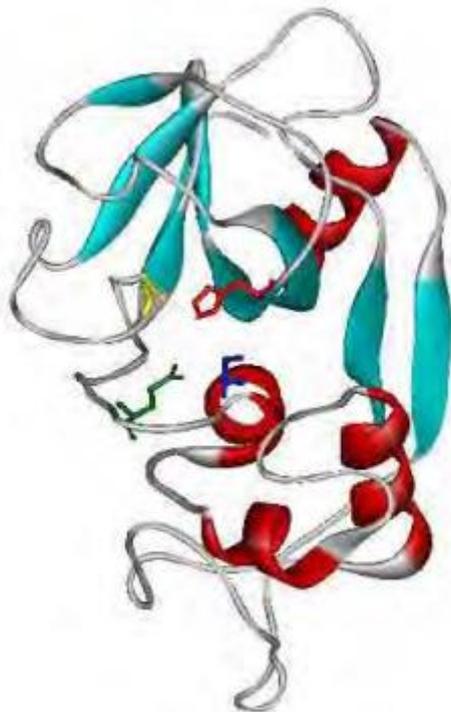
A classificação das enzimas é baseada no tipo de reação química que elas catalisam e seu nome é dado, acrescentando-se o sufixo “ase” ao final do nome de seu respectivo substrato. Com isso, elas são organizadas nas seguintes classes: ligases, transferases, liases, oxidorredutases, isomerases e hidrolases. As enzimas que atuam no catabolismo das proteínas são chamadas proteases (EC 3.4.) e se enquadram na classe das hidrolases, visto que sua função é catalisar a hidrólise das ligações peptídicas responsáveis por unir os resíduos de aminoácidos formadores das proteínas (NELSON; COX, 2019). Essas enzimas atuam na clivagem de

ligações peptídicas relacionadas à aminoácidos de carga positiva, como a lisina, arginina e resíduos posteriores à fenilalanina (AMRI; MAMBOYA, 2012).

Através do látex dos frutos ainda verdes de *Carica papaya* obtém-se a papaína (EC 3.4.22.2), uma enzima proteolítica pertencente ao grupo das cisteína proteases. A ação catalítica desta enzima está diretamente relacionada com a sua conformação tridimensional, sendo que seu sítio ativo se localiza em uma fenda formada entre dois domínios cujos tamanhos são semelhantes, porém as conformações são diferentes. O sítio catalítico desta enzima é constituído de resíduos do aminoácido cisteína que se localizam nas posições cisteína-25, histina-159 e aspartato-158 (BORELLA et al., 2016). Sua cadeia polipeptídica é formada por 211 resíduos de aminoácidos, cuja ativação se dá na faixa de pH com valores entre 5,0 e 9,0 e sua estabilidade é mantida até a temperatura de aproximadamente 90°C quando em presença de substrato (JUCA VILLALTA, 2015).

A papaína é um polipeptídeo formado por apenas uma cadeia e que contém três pontes dissulfeto e um grupo sulfidrila, estruturas essas intimamente relacionadas a sua atividade enzimática (Mota et al., 2017). É uma enzima composta por sete resíduos de cisteína e que apresenta na sua estrutura um núcleo de comportamento hidrofóbico R e L, onde o primeiro possui conformação alfa-hélice e folha-beta, já o segundo assume somente a conformação alfa-hélice, com localização amino terminal. Os dois domínios desta proteína, mostrados na Figura 3, são unidos através de ligações de natureza eletrostática, ligações de hidrogênio e efeitos hidrofóbicos (Mota et al., 2017). É uma enzima solúvel em água e insolúvel em solventes mais apolares como etanol, apresentando coloração de amarelada à incolor quando em solução aquosa e sua inativação ocorre na presença de agentes oxidantes, luz e calor (Mota et al., 2017).

Figura 3 - Estrutura da Papaína (PDB ID: 9PAP), Kamphuis et al., 1984. Os resíduos Cys-25 (azul) e Gln-19 (verde) se encontram em um domínio, já os resíduos His-159 (vermelho) e Asn-175 (amarelo), estão no domínio oposto ao da Cys-25.



Fonte: repositorio.unesp.br Acesso em 27/12/22.

A papaína, devido a sua grande capacidade proteolítica, apresenta notável potencial comercial (FERNÁNDEZ-LUCAS; CASTAÑEDA; HORMIGO, 2017). Segundo Mota et al. (2017), a papaína possui inúmeras atuações para diversas finalidades, como amaciador de carnes, remoção de substâncias alergênicas de alimentos, na produção de lácteos, produção de peptídeos bioativos, tratamento de água, fermentação, clareador dentário, bactericida, dentre várias outras aplicações.

3.3 Eimeriose

A eimeriose é uma doença infecciosa, responsável por causar danos ao sistema gastrointestinal, frequentemente manifestada em animais ruminantes (BAYER, 2016). As espécies de *Eimeria* consideradas mais importantes em termos de patogenicidade são *E. zuernii* e *E. bovis* em bovinos e *E. ovinoidalis* em ovinos. Os sintomas frequentemente causados por estas espécies são desidratação, anorexia, diarreia com presença de sangue, perda de peso e até mesmo a morte do hospedeiro (CRUVINEL et al., 2018).

Eimeria é um protozoário da subclasse Coccídea, do gênero *Eimeria*, que pertence à família Eimeriidae, da classe Sporozoasida. As doenças causadas por estes protozoários são frequentemente chamadas de coccidiose. Os casos de coccidiose são causados por infecções onde, em sua maioria, estão presentes mais de uma espécie desses protozoários que interagem entre si (DANTAS et al., 2015).

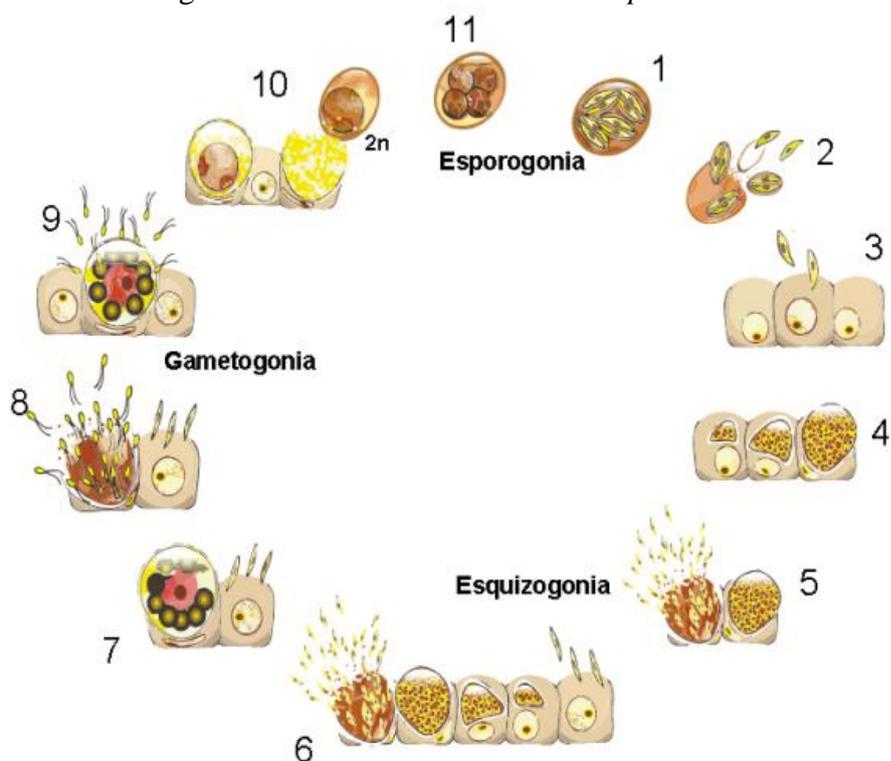
Eimeria sp. são parasitas mononexos, que são aqueles que completam seu ciclo de vida tendo apenas um hospedeiro. Este ciclo é dividido em duas fases, como mostrado na Figura 4, sendo elas: a exógena que ocorre no meio ambiente, onde se dá a esporulação dos oocistos e a endógena que ocorre dentro das células intestinais do hospedeiro, na qual o parasita sofre algumas divisões. A esporulação dos oocistos é condicionada a alguns fatores ambientais importantes como a presença de oxigênio, umidade e temperatura. Estes parasitas possuem alta taxa de reprodução dentro das células do hospedeiro, sendo cada oocisto capaz de gerar milhões de novos oocistos, que são eliminados no ambiente por meio das fezes do animal contaminado (DENIZ, 2015).

O início da fase exógena se dá quando os oocistos são eliminados pelo hospedeiro no ambiente, contaminando-o. Estes oocistos se estiverem em condições climáticas favoráveis, serão esporulados em um período de dois a quinze dias. Na esporulação o oocisto não esporulado sofre algumas mudanças, que se iniciam com duas divisões do seu núcleo e sua massa protoplasmática, gerando quatro estruturas em formato cônico. A partir desse ponto acontecem várias outras alterações como mudanças de forma, divisões e secreção de uma parede retrátil. Essas mudanças acontecem até que o oocisto apresente quatro esporocistos, com dois esporozoítos cada, envoltos por uma parede externa, que é chamado oocisto esporulado, sendo o seu estado infectante (KEETON & NAVARRE, 2017).

Já a fase endógena se inicia com a ingestão pelo animal, dos oocistos na forma esporulada, através de água ou alimento contaminados. Quando estes oocistos chegam ao aparelho digestivo do hospedeiro, são atacados pelas enzimas digestivas que destroem sua parede externa liberando os esporozoítos no lúmen intestinal e estes tomam conta das células da mucosa. Após a entrada nas células do intestino, os esporozoítos se transformam em trofozoítos. Com isso inicia-se o processo de divisão celular dando origem aos esquizontes. Estes, formados em grande quantidade, ao se maturarem dão origem a merozoítos, responsáveis por infectar outras células intestinais. Daí em diante ocorrem várias etapas de diferenciação e divisão celular para a produção de mais merozoítos, sendo que este processo se repete até que se tenha uma quantidade fixa de gerações de merozoítos, após isso a fase de reprodução sexuada é iniciada pela última geração de merozoítos (DENIZ, 2015).

Na reprodução sexuada, também chamada de gametogonia, os merozoítos da última geração dão origem a micro e macrogametócitos, que após o rompimento da célula intestinal do hospedeiro um microgametócito se funde a um macrogametócito formando o zigoto. Este, forma uma parede externa a sua volta, se transformando em um oocisto não esporulado que vai para o lúmen intestinal onde será eliminado para o ambiente por meio das fezes do animal contaminado (TAYLOR et al., 2017).

Figura 4 - Ciclo de vida da *Eimeria sp.*



FONTE: Pôster de divulgação: “Entendendo e Controlando a Coccidiose aviária”, Arte gráfica: Helton Barreiro, Patrocínio Biovet, Edição geral Oswaldo Gessulli Neto (Gessulli Agribusiness).

A parede externa do oocisto é bem desenvolvida, sendo impermeável a soluções, como desinfetantes e detergentes, porém apresenta permeabilidade a substâncias apolares, solúveis no meio lipídico, e ao bromometano e a amônia. Além disso, apresenta resistência à ação de enzimas proteolíticas (Mai et al., 2009).

Esta parede externa é composta por carboidratos, lipídeos e proteínas formando uma estrutura em camadas multilamelares. Os principais carboidratos presentes são: glicose, galactose, manose e hexosamina. Já os lipídeos observados são ácidos e álcoois graxos, além de esteroides (Stotish et al., 1978). Com relação às proteínas presentes, as mais estudadas e

relatadas são GAM56 e GAM82, pois estas proteínas apresentam grande importância no processo de maturação dessa parede externa dos oocistos (Belli et al., 2009).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Parte experimental

Os oocistos de *Eimeria bovis* foram coletados na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) na cidade de Belo Horizonte, e posteriormente enviados para o Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde foram purificados e realizados todos os testes. Todos os solventes e reagentes utilizados nos testes estão listados a seguir:

- Água destilada;
- Látex de mamoeiro;
- Cloreto de sódio PA Êxodo®;
- Papaína pura Dinâmica®;
- Etanol 99,5% PA Vetec®;

Os equipamentos e materiais utilizados encontram-se na lista abaixo:

- Microscópio óptico;
- Ebulidor para banho maria;
- Balança
- Estufa;
- Vórtex;
- Centrífuga;
- Tubos do tipo Falcon de 15 mL;
- Tubos do tipo Eppendorf de 1,5 mL
- Pipetas automáticas.

4.1.1 Extração e obtenção dos oocistos

Primeiro foi feita a coleta de fezes de bezerros previamente inoculados com o isolado da espécie de *Eimeria bovis*. Foi constatado que eles estavam eliminando oocistos nas fezes através do exame de OOPG (técnica de Gordon e Whitlock modificada) (WHITLOCK; 1948). Após isso, adicionamos dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_4$) 2,5% às fezes coletadas na proporção

de 1 de fezes para 2 de dicromato. Essa mistura ficou de 7 a 10 dias em temperatura ambiente para que ocorresse a esporulação. Durante esse período, a amostra foi homogeneizada diariamente para que ocorresse aeração, procedimento necessário para a esporulação dos oocistos.

4.1.2 Purificação das amostras

Após a chegada das amostras ao departamento de química da UFLA, estas se apresentavam muito escuras e sujas, pois ainda estavam na solução de dicromato e com muitos resíduos de fezes animais. Diante disso, o primeiro passo foi a sua purificação que foi feita por centrifugação a 3600 G durante 5 minutos. A primeira centrifugação realizada teve como objetivo a retirada da solução de dicromato de potássio, após isso se foi adicionando água destilada e centrifugando várias vezes até que a solução restante ficasse límpida. Porém, após a última centrifugação a amostra se encontrava muito diluída, com poucos oocistos por unidade de volume, então para corrigir este problema utilizou-se o método de concentração por flutuação de Willis (Willis, 1921), o qual busca concentrar os oocistos na superfície da solução por diferença de densidade. Este método consiste em adicionar uma solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) à amostra que contém os oocistos até que o volume chegue a borda do frasco e colocar uma lâmina de microscópio sobre a sua boca de modo que esta fique em contato com o líquido por cerca de 5 minutos. Após esse tempo a lâmina deve ser retirada, virando rapidamente a gota da solução para cima, então esta é observada ao microscópio para ver se possui uma quantidade considerável de oocistos. Em seguida, é adicionado a gota 20 μ L de água destilada e esta é recolhida em um novo recipiente, este processo é repetido até a obtenção de oocistos puros.

4.1.3 Preparação das soluções e montagem dos testes

As soluções preparadas foram de látex de mamoeiro, látex de mamoeiro desnaturado e papaína pura, nas seguintes concentrações (m/V): 10%, 15%, 30% e 25%. Para a preparação dessas soluções calculou-se a massa necessária de soluto para se obter 5 mL da solução desejada na respectiva concentração. Após a pesagem da massa calculada, a dissolução do soluto foi feita em um Tubo do tipo Falcon de 15 mL com o auxílio de um vórtex, para uma completa homogeneização e solubilização do soluto. Preparou-se duas soluções idênticas de látex para cada concentração, uma delas foi reservada para os testes, assim como a de papaína,

e a outra foi colocada em banho maria com água em ebulição à aproximadamente 97°C por 4 horas, cujo objetivo foi a completa desnaturação de todas as proteínas presentes no látex.

Para a montagem dos testes, inicialmente calculou-se a quantidade média de oocistos presentes em 10µL da amostra purificada, para isso foi pipetado esse exato volume na lâmina do microscópio e os oocistos contados um a um, esse procedimento foi repetido por 5 vezes e então sua média foi calculada.

Para os testes foram utilizados 24 tubos do tipo eppendorf de 1,5 mL, sendo destinados 6 tubos para cada solução preparada (látex, látex desnaturado e papaína pura), além do controle feito com água destilada. Com o auxílio de pipetas automáticas, pipetou-se 10µL da amostra contendo os oocistos purificados em cada tubo eppendorf, em seguida foram pipetados 20µL das soluções preparadas de látex, látex desnaturado, papaína pura e a água destilada, sendo cada solução pipetada em 6 tubos eppendorf de forma separada. Após a montagem dos testes, estes foram mantidos em uma estufa a temperatura de 27°C, onde o teste com as soluções à concentração de 10% (m/V), primeiro teste realizado, permaneceu por 24 horas, já os testes com as demais concentrações, além de uma repetição do de 10% (m/V), permaneceram por 48 horas na estufa à mesma temperatura do inicial.

4.2 Contagem dos oocistos e análise estatística

Após a retirada dos testes da estufa, procedeu-se com a contagem dos oocistos restantes em cada eppendorf. Para isso, com o auxílio de uma micropipeta automática, todo o conteúdo do eppendorf foi transferido para a lâmina do microscópio e os oocistos que permaneceram íntegros foram contados um a um, repetindo os mesmos passos para todas as soluções e o controle. Após o término da contagem, calculou-se a quantidade média para cada solução e para o controle.

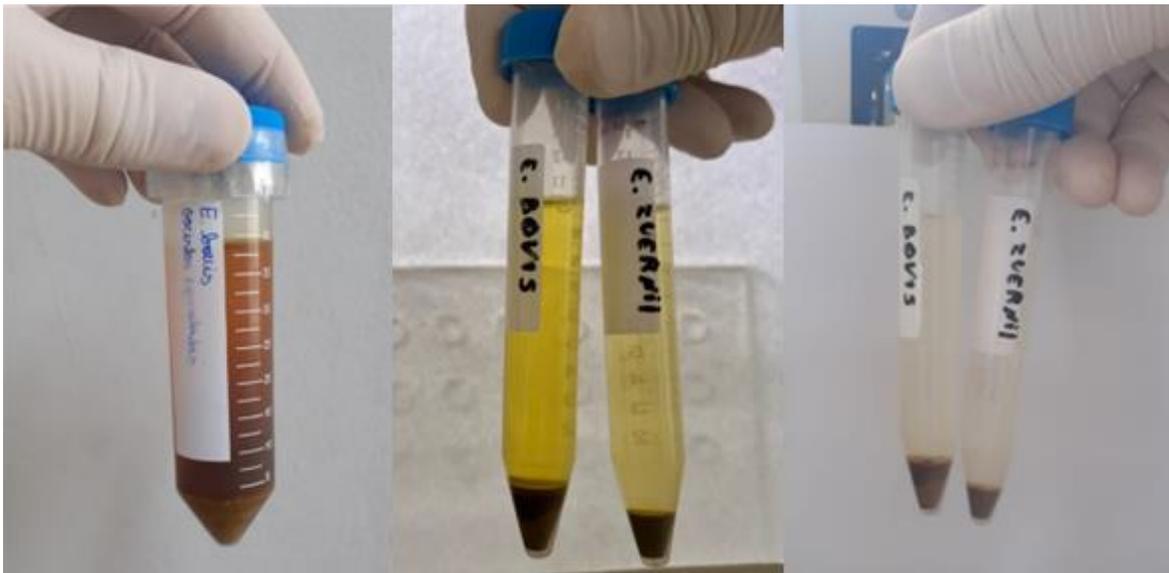
O efeito da ação proteolítica do látex de *C. papaya* e da papaína sobre os oocistos de *E. bovis* foi avaliada por análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey ao nível de 5% e 1% de probabilidade. Além disso, o percentual de redução da média de oocistos também foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{Redução} = \frac{(\text{Média de oocistos íntegros do controle} - \text{Médias de oocistos íntegros do tratamento})}{\text{Média de oocistos íntegros do controle}} \times 100$$

5. RESULTADOS

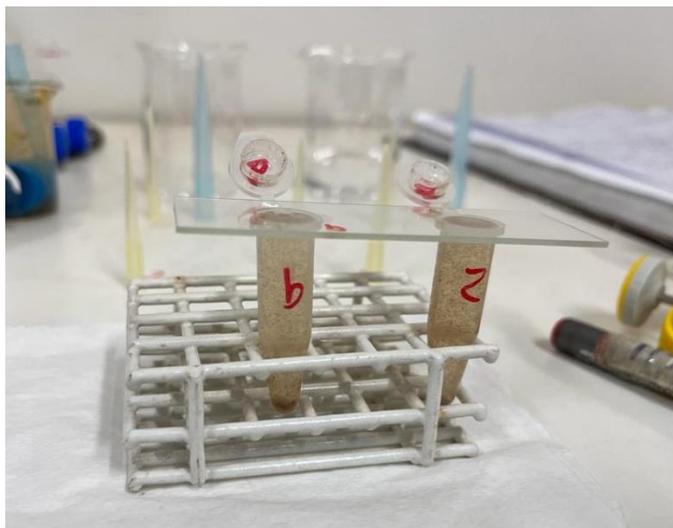
O processo de purificação das amostras por centrifugação pode ser observado na Figura 5. Após a etapa de purificação, a concentração de oocistos estava abaixo do esperado para a realização dos testes, então com o objetivo de corrigir este problema foi utilizado o método de concentração por flutuação de Willis, representado pela Figura 6, o qual busca concentrar os oocistos na superfície da solução por diferença de densidade.

Figura 5 - Purificação das amostras provenientes da UFMG, contendo oocistos de *Eimeria bovis* em solução de dicromato de potássio, após sucessivas centrifugações e lavagens com água destilada, estando a amostra original à esquerda e a purificada à direita.



Fonte: Do autor (2023).

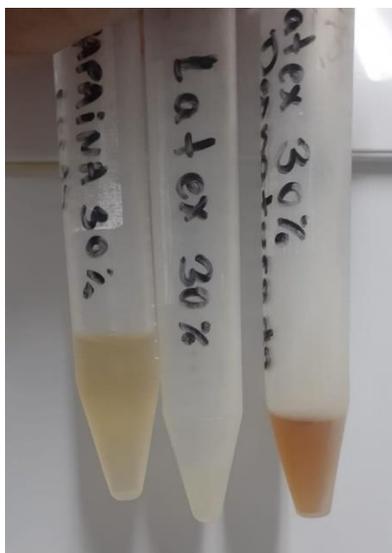
Figura 6 - Concentração dos oocistos pelo método de flutuação de Willis.



Fonte: Do autor (2023).

Com o objetivo de avaliar a capacidade de ação proteolítica das enzimas, presentes no látex do mamoeiro (*C. papaya*) e da papaína de forma isolada, sobre a membrana externa dos oocistos de *E. bovis*, foram preparadas as soluções de tratamento em diferentes concentrações m/V (10%, 15%, 25% e 30%). Tais soluções são de látex, papaína pura e látex desnaturado, que após serem preparadas foram centrifugadas para a retirada de possíveis resíduos sólidos, para que ficassem límpidas. O aspecto final dessas soluções pode ser observado na Figura 7 que é referente a concentração de 30%.

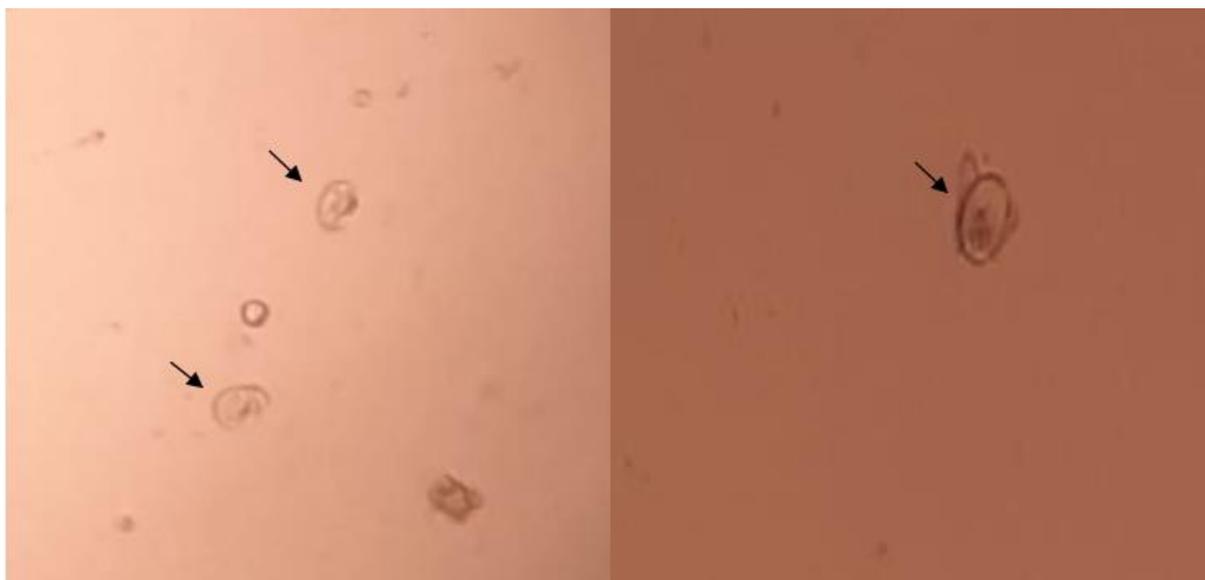
Figura 7 - Soluções para a montagem dos testes com concentração de 30%, sendo da esquerda para a direita: papaína pura, látex de mamoeiro e látex de mamoeiro desnaturado.



Fonte: Do autor (2023).

A partir da purificação das amostras contendo os oocistos e da preparação das soluções para o tratamento, os testes puderam ser iniciados. Para isso se fez necessário ter conhecimento da morfologia dos oocistos esporulados e não esporulados, representados na Figura 8, antes de iniciar o tratamento com as soluções preparadas, para efeito de comparação ao final do teste realizado. Os testes consistiram em 6 replicatas para cada tratamento e para o controle (água destilada), onde cada replicata consistiu na mistura de 10 μ L da amostra contendo os oocistos com 20 μ L da solução tratamento, em um tubo do tipo eppendorf de 1,5 mL, conforme mostrado na Figura 9, onde permaneceram por um período de 48 horas.

Figura 8 - Oocistos de *Eimeria bovis* na solução controle (água destilada), indicados pelas setas, sendo esporulado à esquerda e não esporulado à direita.



Fonte: Do autor (2023).

Figura 9 - Montagem do teste com 6 repetições para cada solução (tratamento) e para o controle feito com água destilada, sendo de cima para baixo: controle, látex de mamoeiro, papaína pura e látex de mamoeiro desnaturado.



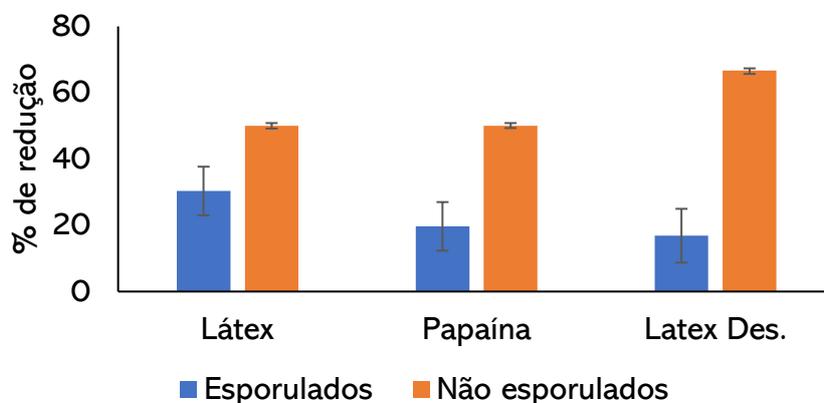
Fonte: Do autor (2023).

Com o fim do período de incubação dos testes, foi realizada a contagem dos oocistos esporulados e não esporulados que permaneceram inalterados após o tratamento. Com a contagem feita procedeu-se com uma análise estatística nos resultados obtidos, a fim de verificar se o tratamento causou diferença significativa no número de oocistos quando comparado à solução controle.

Em se tratando dos testes com as soluções tratamento à concentração de 10% e 15%, ambos com período de incubação de 48 horas, estas apresentaram os percentuais médios e seus respectivos desvios padrão de acordo com o número de oocistos contados, o que pode ser observado nas Figuras 10 e 11. Assim, temos que os percentuais médios de redução dos grupos tratados em relação ao grupo controle foram os seguintes: com 10% de concentração, látex (30,34% esporulados, 50% não esporulados), papaína (19,66% esporulados, 50% não esporulados), látex desnaturado (16,85% esporulados, 66,67% não esporulado); e com 15% de concentração, látex (4,67% esporulados, 11,11% não esporulados), papaína (20,09% esporulados, 33,3% não esporulados), látex desnaturado (31,31% esporulados, 66,67% não esporulado). Porém, apesar de apresentarem um percentual de redução na quantidade de

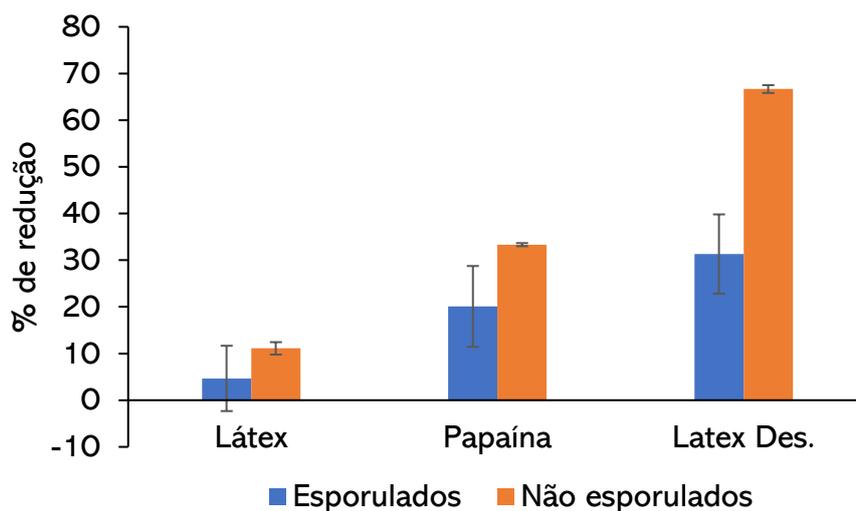
oocistos quando comparados com seus respectivos controles, não apresentaram diferença estatística relevante.

Figura 10 - Percentual de redução do número de oocistos de *Eimeria bovis*, em relação ao controle, para os tratamentos com látex de mamoeiro, papaína pura e látex de mamoeiro desnaturado, à 10% durante 48 horas.



Fonte: Do autor (2023).

Figura 11 - Percentual de redução do número de oocistos de *Eimeria bovis*, em relação ao controle, para os tratamentos com látex de mamoeiro, papaína pura e látex de mamoeiro desnaturado, à 15% durante 48 horas.

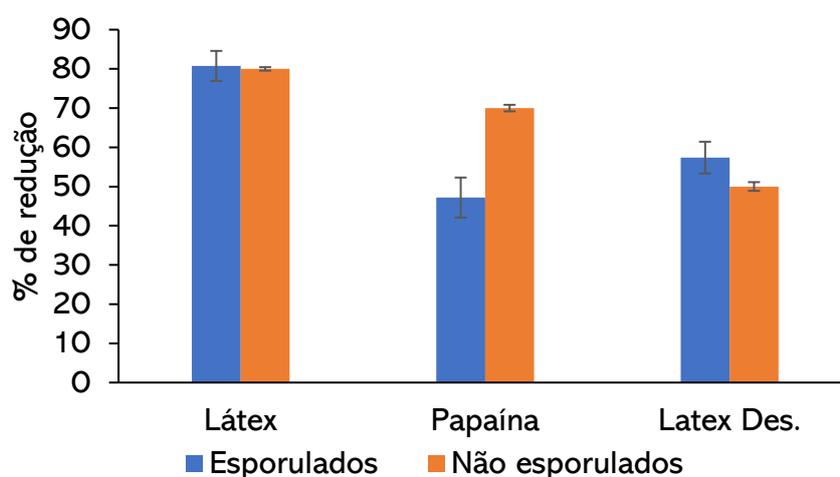


Fonte: Do autor (2023).

Já com relação ao teste cujas soluções tratamento estavam em concentração de 30%, com 48 horas de incubação, notou-se um percentual de redução expressivo no número de oocistos em relação ao controle, Látex (80,75% esporulados, 80% não esporulados), papaína

(47,17% esporulados, 70% não esporulados) e látex desnaturado (57,36% esporulado, 50% não esporulados), dos quais se destaca o realizado com solução de látex, conforme mostrado na Figura 12. Apesar da grande porcentagem de redução no número de oocistos em relação ao controle, apenas os oocistos esporulados sofreram uma redução estatisticamente relevante. Onde foram realizados o teste de Tukey ($p < 0,01$) e o teste t ($p < 0,05$) (testes estatísticos), sendo que ambos encontraram diferença relevante entre o controle e cada uma das soluções tratamento.

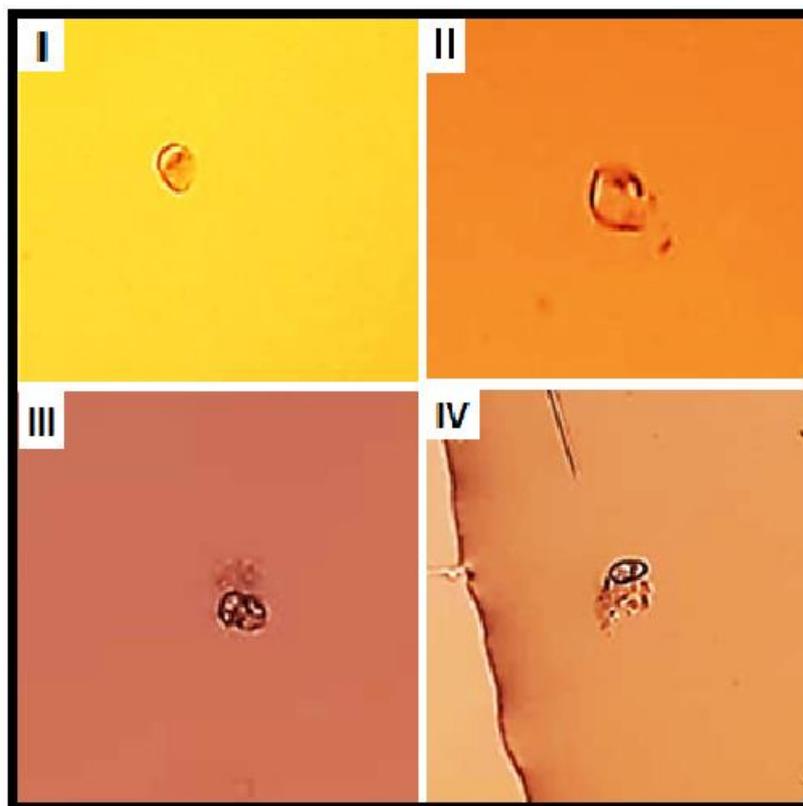
Figura 12 - Percentual de redução do número de oocistos de *Eimeria bovis*, em relação ao controle, para os tratamentos com látex de mamoeiro, papaína pura e látex de mamoeiro desnaturado, à 30% durante 48 horas.



Fonte: Do autor (2023).

Além disso, foram realizados outros dois testes, um com soluções tratamento com 10% (m/V) de concentração (látex, látex desnaturado e papaína pura) e com tempo de incubação de apenas 24 horas e outro com soluções à 25% (m/V) e incubação de 48 horas. Estes testes apresentaram resultados equivocados, pois o número de oocistos contados nas soluções tratamento após a incubação se apresentou maior que a quantidade obtida no controle, o que caracteriza um erro experimental já que a quantidade encontrada nos tratamentos deve ser menor que ou igual a do controle. A Figura 13 representa o estado final de alguns oocistos que sofreram digestão após o tempo de tratamento em algumas soluções.

Figura 13 - Exemplos de oocistos de *E. bovis* após sofrerem digestão pelas soluções tratamento. Estando em látex de mamoeiro 10% (I), látex de mamoeiro desnaturado 15% (II), papaína pura 30% (III) e látex de mamoeiro desnaturado 25% (IV).



Fonte: Do autor (2023).

6. DISCUSSÃO

Os tratamentos utilizados nos testes tiveram como objetivo testar a ação do látex e da papaína isolada sobre os oocistos de *E. bovis*, sendo o tratamento com látex desnaturado utilizado para verificar se outras substâncias presentes no látex, além da papaína e de outras enzimas, também apresentam ação de digestão sobre os oocistos.

Os testes realizados com as soluções tratamento à concentração de 10% e 15%, apesar da porcentagem de redução apresentada no número de oocistos em relação ao controle, não caracterizaram diferença estatisticamente relevante, provavelmente devido ao grande desvio padrão apresentado. Apesar disso, em ambos os testes foi possível notar que os oocistos não esporulados sofreram uma maior ação de degradação em todos os três tratamentos. Já o teste realizado à 30%, apresentou grandes porcentagens de redução, porém apenas os oocistos esporulados sofreram uma variação estatisticamente relevante, o que foi observado em todos os tratamentos desse teste, mesmo com os oocistos não esporulados apresentando uma maior porcentagem de redução do que os esporulados na solução de papaína.

Ao se comparar os gráficos das diferentes concentrações dos tratamentos (Figuras 5.6, 5.7 e 5.8), podemos notar que em todos os testes realizados o tratamento à base de papaína pura teve maior ação sobre os oocistos não esporulados. Os tratamentos a base de látex e de látex desnaturado, também agiram de forma semelhante, atuando com maior eficácia sobre os oocistos não esporulados quando em soluções mais diluídas, 10% e 15%, porém na concentração mais elevada, à 30%, ambos apresentaram maior ação sobre os oocistos esporulados.

O látex de mamoeiro possui, além de grande quantidade de enzimas, várias substâncias não proteicas como ácidos graxos, álcoois terpênicos, esteróis e pequenas cadeias de poliisopreno ligadas a fosfolipídios (BAROUH et al.; 2010). Ao desnaturar o látex, suas enzimas são inativadas, não sendo mais capazes de atuar na digestão da membrana externa dos oocistos. Porém, foi observado que o látex desnaturado agiu sobre os oocistos, reduzindo a quantidade destes em relação ao controle, logo evidencia-se que a ação do látex desnaturado sobre os oocistos foi exercida por seus componentes de natureza não proteica. Outro fato que corrobora com essa hipótese é que o látex apresentou, na maioria dos testes realizados, maior atividade sobre os oocistos quando comparado a papaína isolada, o que seria resultado de uma ação combinada entre as enzimas e os componentes não proteicos.

Até o presente momento ainda não há estudos publicados sobre a ação do látex de mamoeiro e da papaína sobre oocistos de *Eimeria spp.*, porém acredita-se que o mecanismo de ação da papaína seja semelhante ao de outras proteases, como a bromelina. Segundo Cedric et al. (2018), o extrato de bromelina pode inibir a esporulação dos oocistos por meio da inativação de enzimas endógenas que atuam no processo de esporulação. Esses extratos também podem penetrar a camada externa dos oocistos e destruir componentes intracelulares, culminando no amolecimento e na danificação da massa citoplasmática central (ABBAS et al.; 2019). Além disso, Daiba et al. (2022) notaram que o extrato de bromelina também é capaz de causar o amolecimento da parede que envolve os oocistos, facilitando seu rompimento.

Atualmente, a coccidiose é tratada por meio do uso de substâncias anticoccidianas, que são administradas por via oral ou por meio de ração e água. Tais drogas incluem toltrazuril, diclazuril, amprólio, decoquinato e sulfonamida (ODDEN et al.; 2019). Porém, devido ao uso feito de forma incorreta e excessiva de tais substâncias levou ao surgimento de cepas resistentes de *Eimeria spp.* (HEMA et al.; 2015). Há também a crescente preocupação do mercado consumidor quanto a possível presença de resíduos desses medicamentos no leite e na carne que são consumidos. Esse acumulado de fatos negativos acabou por estimular o uso de extratos

vegetais para o desenvolvimento de novos medicamentos, pois estes são tidos como naturais e sustentáveis (DAIBA et al.; 2022).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através desse trabalho foi possível concluir que a solução de látex de mamoeiro (*C. papaya*) e de papaína pura são capazes de agir sobre a membrana externa dos oocistos esporulados e não esporulados de *E. bovis*, interrompendo seu ciclo de vida. Sugere-se também que a ação do látex sobre os oocistos não se dá somente por meio de suas enzimas, mas também por outros componentes, como mostrado por meio do teste com látex desnaturado.

Extratos vegetais, como o látex de mamoeiro, apresentam grandes perspectivas para usos futuros, visto que são compostos naturais e sustentáveis, além de apresentarem uma possível vantagem econômica, permitindo o desenvolvimento de medicamentos com baixo custo para o produtor rural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS A, ABBAS R.Z, RAZA M.A, KHAN M.K, SALEEMI M.K, SAEED Z. *In vitro* anticoccidial activity of *Trachyspermum ammi* (Ajwain) extract on oocysts of *Eimeria* species of chicken. **Adv. Life Sci.** 2019;7(1):44–47.
- AGE/MAPA, 2014. **Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<https://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2014/12/produto-interno-bruto-da-agropecuaria-deve-ser-de-rs-1-trilhao>> acesso em: 21 de fevereiro de 2023.
- ALTINKAYNAK, C.; TAVLASOGLU, S.; OCSOY, I. A new generation approach in enzyme immobilization: Organic-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced catalytic activity and stability. **Enzyme and microbial technology**, v. 93, p. 105-112, 2016.
- AMRI, E.; MAMBOYA, F. **Papain, a plant enzyme of biological importance: A review**. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, v.8, n. 2, p. 99-104, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2012.99.104>
- BAROUH, N. et al. Neutral lipid characterization of non-water-soluble fractions of carica papaya latex. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 9, p. 987–995, 2010.
- BAYER. **Bovinos, Equinos, Ovinos e Caprinos: Coccidiose**. 2016. Disponível em <<https://www.saudeanimal.bayer.com.br/pt/bovinos/doencas/visualizar.php?codDoenca=coccidiose>>. Acesso em: 30 Dez. 2022.
- BELLI SI, FERGUSON DJ, KATRIB M, SLAPETOVA I, MAI K, SLAPETA J, FLOWERS SA, MISKA KB, TOMLEY FM, SHIRLEY MW, WALLACH MG, SMITH NC. **Conservation of proteins involved in oocyst wall formation in *Eimeria maxima*, *Eimeria tenella* and *Eimeria acervulina***. Int J Parasitol. 2009 Aug;39(10):1063-70.
- BORELLA, J. C.; SIMÕES, R. F.; PUGA, R. L. A.; STEVANATO, M. C. B. **Avaliação da estabilidade e da atividade enzimática de soluções de papaína utilizadas no desbridamento e cicatrização de feridas**. Infarma. Cien. Farmac., v. 28, n. 3, p. 179- 184, 2016.
- BORELLA, J.C.; STEVANATO, M.C.B.. Análise sazonal da produção e da atividade enzimática de látex fresco coletado de frutos de plantas femininas e hermafroditas de mamão (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 17, n. 43, p. 1112-1117, 08 jul. 2015. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/15_002.
- CEDRIC Y, PAYNE V.K, NADIA N.A.C, KODJIO N, KOLLINS E, MEGWI L, KUIATE J.R, MBIDA M. *In vitro* anticoccidial, antioxidant activities and cytotoxicity of *Psidium guajava* extracts. **Res. J. Parasitol.** 2018;13(1):1–13.
- CRUVINEL, L. B.; BASTOS, T.S.A.; NICARETTA, J. E.; COUTO, L. F. M.; BORGES, D.G.L.; BORGES, F. A.; SOARES, V. E. ; WELBER. D.Z. Surtos consecutivos ocasionados por *Eimeria Zuernii* em bezerros de corte de uma propriedade do estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 38(2):277-284, fevereiro de 2018.

DAIBA, A. R.; KAGIRA, J. M.; NGOTHO, M.; KIMOTHO, J.; MAINA, N. In vitro anticoccidial activity of nanoencapsulated bromelain against *Eimeria* spp. oocysts isolated from goats in Kenya. **Veterinary World**, [S.L.], p. 397-402, 22 fev. 2022. Veterinary World. <http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2022.397-402>.

DANTAS, P. C. S.; LIMA, D. S.; OLIVEIRA, F. J.; CALASANS, T. A. S.; PORTO, A. G.; CARVALHO, C. D.; JERALDO, V. L. S., ALLEGRETTI, S. M.; MELO, C. M. Ocorrência de parasitoses gastrintestinais em vacas leiteiras e respectivos bezerros durante o período de amamentação, na Fazenda São Paulinho, Município de Itapicuru/BA. **Scientia Plena**, v. 11, n.4, 2015.

DENIZ, A. Uso preventivo do toltrazuril para controle da coccidiose em cabritos de corte criados em região semiárida. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, vol.16, n.1, p.179 - 189, 2015.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistics Division**. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/e> . Acesso em: 16 de setembro de 2015.

FERNÁNDEZ-LUCAS, J.; CASTAÑEDA, D.; HORMIGO, D. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 68, p. 91-101, 2017.

FONSECA, B. L.; OLIVEIRA, C. A. A.; OLIVEIRA, G. A.; MARANHÃO, A. C. P. M.; ALVES, L. L. P.; GUIMARÃES, D. S.; CRUZ, R. K. S.; PIMENTEL, M. M. L.; BASTOS, F. J. F.; BASTOS, I. V. M. Estudo Da Patogenia Das Principais Endoparasitoses Gastrintestinais De Bovinos: Revisão de Literatura. **Brazilian Journals Publicações de Periódicos e Editora**, São José dos Pinhais, v. 1, n. 8, p. 98-113, jan. 2023. Disponível em: <https://brazilianjournals.com.br/assets/ebooks/T845O453NQsz0F617u5po0I9VHMcxbnD.pdf#page=108>. Acesso em: 22 fev. 2023.

GOMES, G. R. **Fatores que influenciam a saúde de bezerros durante o aleitamento**. Trabalho de Conclusão de Curso-Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2018.

HEMA S, ARUN T, SENTHILKUMAR B, SENBAGAM D, SURESHKUMAR M. *In vivo* anticoccidial effects of *Azadirachta indica* and *Carica papaya* L. with salinomycin drug as a dietary feed supplement in broiler chicks. **Pak. J. Pharm. Sci.** 2015; 28(4):1409–1415.

JUCA VILLALTA, D. N. **Estudio de factibilidad de la utilización de enzimas vegetales en la elaboración del queso tipo fresco**. 2015. 97p. Trabalho de Conclusão de Curso. 34 Facultad de ciencia y tecnologia. Escuela de ingeniería em alimentos. Universidad del Azuay. Cuenca – Ecuador.

KEETON, S.T.N.; NAVARRE, C.B. Coccidiosis in Large and Small Ruminants. **Vet. Clin.NorthAm. Food Anim. Pract.**, v.34, n.1, p.201-208, 2017.

LAVANYA, B., MAHESWARAN, A., VIMAL, N., VIGNESH, K., YUVARANI, K. AND VARSHA, R. (2018). Extraction and effects of papain obtained from leaves of *Carica papaya*: A remedy to dengue fever. **International Journal of Pharmaceutical Science and Research**, 39:234 – 240.

LUCENA R.B., PIEREZAN F., KOMMERS G.D., IRIGOYEN L.F., FIGHERA R.A. & BARROS C.S.L. 2010. **Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos**. Pesq. Vet. Bras. 30(5):428-434.

- MACALOOD, J.S. et al. Revisiting Carica papaya L. latex potentials may resolve agricultural infestation problems. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v.3, n.1, p.95-8, 2014.
- MAI K, SHARMAN PA, WALKER RA, KATRIB M, DE SOUZA D, MCCONVILLE MJ, WALLACH MG, BELLI SI, FERGUSON DJ, SMITH NC. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2009 Mar;104(2):281-9.
- MARQUES, Jonas de Brito Campolina. **Anatomia foliar e do lenho e ontogenia e senescência de glândulas secretoras foliares de Cnidocolus pubescens Pohl (Euphorbiaceae)**. 2017. 92 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2017.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Bovinos**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>. Acesso em: jan. de 2023.
- MOTA, A. A. R.; SANTOS, B. C. DOS; MIRANDA, F. DE M. E S.; LINHARES, I.; DIAS, T. M. DA C.; OLIVEIR, W. A. DE. Evolução histórica dos métodos de extração da papaína: uma revisão da literatura sobre a purificação desta enzima. **Revista de Enfermagem da FACIPLAC**, [s. l.], v. 2, n. 3, 2017.
- MUSIDLAK, O.; BALDYSZ, S.; KRAKOWIAK, M.; NAWROT, R.. Plant latex proteins and their functions. **Advances In Botanical Research**, [S.L.], p. 55-97, 2020. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.abr.2019.11.001>.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2019. E-book. ISBN 9788582715345. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582715345/>. Acesso em: 26 dez. 2022.
- ODDEN A, STUEN S, ENEMARK H.L, ROBERTSON L.J, MOLINA J.M, RUIZ A. Preliminary studies on *in vitro* methods for the evaluation of anticoccidial efficacy/resistance in ruminants. **Exp. Parasitol**. 2019; 201:34–41.
- PESSOA C.R.M., MEDEIROS R.M.T. & RIET-CORREA F. 2013. **Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil**. Pesq. Vet. Bras. 33(6):752-758.
- ROCHA, D. T.; CARVALHO, G. R.; RESENDE, J. C. Cadeia produtiva do leite no Brasil: produção primária. **Embrapa Gado de Leite**, 2020.
- SILVA, E. P., BECKER, F. S., SILVA, F.A., SOARES JÚNIOR, M. S., CALIARI, M., (2015). Bebidas mistas de extratos de arroz com maracujá e mamão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 74(1), 49-56. <https://doi.org/10.53393/rial.2015.v74.33385>
- SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM RURAL (SENAR). **Manejo de pastagens**. Coleção Senar, Senar, 2 ed., Brasília/DF, 2012. Disponível em: <https://sistemafaeg.com.br/senar/cursos-e-treinamentos/pecu-ria/manejo-depastagens>. Acesso em: 21 de fev. De 2023.
- STOTISH, R. L., WANG, C. C. & MEYENHOFER, M. 1978. Structure and composition of the oocyst wall of Eimeria tenella. **The Journal of Parasitology**, 64: 1074-1081
- TAYLOR, M. A. et al. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 1052 p.

Willis HH. **A Simple Levitation Method for the Detection of Hookworm Ova.** Med J Aust [Internet]; 1921 [cited 2023 Jan 22]. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19222900461>

WHITLOCK, H.V., 1948. Some modifications of the McMaster helminth egg-counting technique and apparatus. **J. Counc. Sci. Ind. Res.** Aust., 21:177-180.