

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Antônio Francisco Igor Magalhães de Matos

***Haemonchus contortus*: I. ATIVIDADE DE *Pleurotus ostreatus* EM
DIFERENTES ESTÁDIOS BIOLÓGICOS DO NEMATOIDE; II.
POTENCIAL DO POLI (ÁCIDO LÁTICO-CO-ÁCIDO GLICÓLICO) NO
NANOENCAPSULAMENTO DE IgY ANTI-*H. contortus***

Santa Maria, RS

2021

Antônio Francisco Igor Magalhães de Matos

Haemonchus contortus*: I. ATIVIDADE DE *Pleurotus ostreatus* EM DIFERENTES ESTÁDIOS BIOLÓGICOS DO NEMATOIDE; II. POTENCIAL DO POLI (ÁCIDO LÁTICO-CO-ÁCIDO GLICÓLICO) NO NANOENCAPSULAMENTO DE IgY ANTI-*H. contortus

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof. Dra. Silvia Gonzalez Monteiro

Santa Maria, RS

2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Magalhães de Matos, Antônio Francisco Igor
Haemonchus contortus: I. atividade de Pleurotus
ostreatus em diferentes estádios biológicos do nematoide;
II. potencial do poli (ácido lático-co-ácido glicólico)
no nanoencapsulamento de IgY anti-H. contortus / Antônio
Francisco Igor Magalhães de Matos.- 2021.
103 p.; 30 cm

Orientadora: Silvia Gonzalez Monteiro
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2021

1. Hemoncose 2. Cogumelo 3. Pleurotus ostreatus 4.
Anticorpo 5. PLGA I. Gonzalez Monteiro, Silvia II.
Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.


Declaro, ANTÔNIO FRANCISCO IGOR MAGALHÃES DE MATOS, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Antônio Francisco Igor Magalhães de Matos

Haemonchus contortus*: I. ATIVIDADE DE *Pleurotus ostreatus* EM DIFERENTES ESTÁDIOS BIOLÓGICOS DO NEMATOIDE; II. POTENCIAL DO POLI (ÁCIDO LÁTICO-CO-ÁCIDO GLICÓLICO) NO NANOENCAPSULAMENTO DE IgY ANTI-*H. contortus

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 05 de fevereiro de 2021:



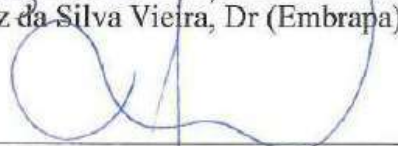
Silvia Gonzalez Monteiro, Dra (UFSM)
(Presidente / Orientador)



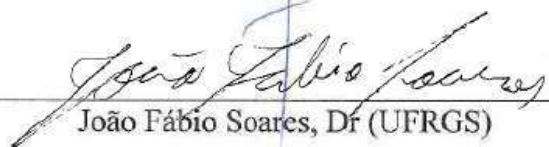
Luciana Dalla Rosa, Dra (UFRGS)



Luiz da Silva Vieira, Dr (Embrapa)



Luís Antônio Sangioni, Dr (UFSM)



João Fábio Soares, Dr (UFRGS)

Santa Maria, RS

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a minha família, que sempre priorizou a minha educação e serviu de pilar durante todo a minha trajetória acadêmica.

A Márjory Sousa por me acompanhar nessa trajetória, sendo uma das principais incentivadoras nessa caminhada.

A minha orientadora, Dra. Silvia Monteiro, por aceitar o desafio de me orientar durante o doutorado, obrigado pela paciência e todo conhecimento compartilhado.

À Universidade Federal de Santa Maria, essa belíssima instituição que pude ter a honra de fazer parte e por toda minha vida vou lembrar dos momentos bons que pude desfrutar nessa Universidade.

A CAPES pelo apoio financeiro ao longo do curso de doutorado.

Agradeço aos colegas do LAPAVET que colaboraram com os trabalhos e pelos momentos de alegria no nosso ambiente de trabalho, com vocês pude dar boas risadas e ter a oportunidade de crescer profissionalmente com muito aprendizado.

Enfim, a todas as pessoas que estiveram comigo nesses anos e me deram suporte para a realização desse trabalho, ficam aqui todo o meu agradecimento.

Dias ruins constroem dias melhores
(Desconhecido)

RESUMO

Haemonchus contortus*: I. ATIVIDADE DE *Pleurotus ostreatus* EM DIFERENTES ESTÁDIOS BIOLÓGICOS DO NEMATOIDE; II. POTENCIAL DO POLI (ÁCIDO LÁTICO-CO-ÁCIDO GLICÓLICO) NO NANOENCAPSULAMENTO DE IgY ANTI-*H. contortus

AUTOR: Antônio Francisco Igor Magalhães de Matos

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Silvia Gonzalez Monteiro

A produção de pequenos ruminantes representa uma das principais fontes de renda para pequenos e médios produtores em regiões tropicais e subtropicais, principalmente nas regiões nordeste e sul do Brasil. Dentre os problemas sanitários que afetam os animais, as doenças parasitárias se destacam como um dos principais fatores limitantes da produtividade e regularidade na oferta dos produtos e derivados. Dados epidemiológicos indicam que mais de 80% da carga parasitária de pequenos ruminantes é constituída pelo helminto *Haemonchus contortus*. Este parasito possui distribuição cosmopolita e é considerado o mais patogênico entre os nematoides gastrointestinais, pois possui hábito hematófago. A enfermidade além de causar a morte de ovinos e caprinos em casos mais graves, pode reduzir a produção e gerar custos adicionais com utilização de antiparasitários. O uso excessivo e indiscriminado de anti-helmínticos resultou na seleção de nematódeos multirresistentes e por consequência, a redução da eficácia dos produtos disponíveis. Dessa forma, estudos que buscam métodos de controle não químicos tornam-se indispensáveis para continuidade deste seguimento. Neste contexto, esta tese foi elaborada com os objetivos de avaliar e aprimorar diferentes alternativas no controle de *H. contortus*: (1) avaliar *in vitro* a atividade ovicida e larvicida do extrato aquoso do cogumelo *Pleurotus ostreatus* e em gerbils experimentalmente infectados com *H. contortus*; (2) analisar o potencial do polímero poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) em diferentes proporções de ácido lático e ácido glicólico (50:50, 82:18) no nanoencapsulamento de imunoglobulinas Y anti-*H. contortus* na liberação *in vitro* e *in vivo* utilizando ratos Wistar. Concluímos assim, que o extrato aquoso de *P. ostreatus* demonstrou efeitos nematicidas em baixas concentrações contra os ovos e larvas de *H. contortus in vitro*, no entanto sem efeitos no teste *in vivo*. Da mesma forma foi demonstrado que as nanoesferas de PLGA têm a capacidade de servir como depósitos de anticorpos IgY e que as nanopartículas podem ser exploradas para a entrega de anticorpos. No entanto, em ambos os estudos são necessários mais avaliações para verificar a resposta das formulações no hospedeiro alvo.

Palavras chave: Hemoncose, *Strongylida*, Cogumelo, *Pleurotus ostreatus*, Anticorpo, PLGA.

ABSTRACT

***Haemonchus contortus*: I. *Pleurotus ostreatus* aCTIVITY AT DIFFERENT BIOLOGICAL STAGES OF THE NEMATODE; II. POTENTIAL OF POLY (LACTIC ACID-CO-GLYCOLIC ACID) IN ANTI-*H. contortus* IgY NANOENCAPSULATION.**

AUTHOR: Antônio Francisco Igor Magalhães de Matos

ADVISOR: Prof^ª. Dr^ª. Silvia Gonzalez Monteiro

The production of small ruminants is one of the main sources of income for small and medium farmers in tropical and subtropical regions, mainly in the northeast and south regions of Brazil. Among the health problems that affect animals, parasitic diseases stand out as one of the main factors limiting productivity and regularity in the offer of products and derivatives. Epidemiological data indicate that more than 80% of the parasitic load of small ruminants is made up of the helminth *Haemonchus contortus*. This parasite has a cosmopolitan distribution and is considered the most pathogenic among gastrointestinal nematodes, as it has a blood-sucking habit. The disease in addition to causing the death of sheep and goats in more severe cases, can reduce production and generate additional costs with the use of antiparasitic agents. Due to the importance of control, the excessive and indiscriminate use of anthelmintic resulted in the selection of multi-resistant nematodes and, consequently, a reduction in the action of the available products. Thus, studies that seek non-chemical control methods are essential. Therefore, this thesis was developed with the objectives of evaluating and improving different alternatives in the control of *H. contortus*: (1) to evaluate *in vitro* the ovicidal and larvicidal activity of the aqueous extract of the mushroom *Pleurotus ostreatus* and in gerbils experimentally infected with *H. contortus*; (2) to analyse the potential of the poly (lactic acid-co-glycolic acid) polymer (PLGA) in different proportions of lactic acid and glycolic acid (50:50, 82:18) in the anti-*H. contortus* immunoglobulin Y nanoencapsulation *in vitro* and *in vivo* release using Wistar rats. We conclude that the aqueous extract of *P. ostreatus* demonstrated nematocidal effects in low concentrations against eggs and larvae of *H. contortus* *in vitro*, however without effects in the *in vivo* test. Likewise, we demonstrate that PLGA nanospheres have the ability to serve as deposits of IgY antibodies and that nanoparticles can be exploited for the delivery of antibodies. However, in both studies, further evaluations are needed to verify the response of the formulations in the target host.

Keywords: Barberworm, *Strongylida*, Mushroom, Antibody, PLGA

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	Aqueous extract
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
EC50	50% effective concentration
EHT	Egg hatch test
EI	Electron ionisation
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAMACHA	Faffa Malan Chart
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
GC-MS	Gas chromatography - mass spectrometry
GIN	Gastrointestinal nematode
IgY	Imunoglobulina Y
LDT	Larval development test
LMT	Larval migration test
NTA	Nematicidal activity
OPG	Ovos por gramas de fezes
PBS	Phosphate-buffered saline
PBS-GT	Phosphate-buffered saline gelatin
PLGA	Poly lactic-co-glycolic acid
PVA	Polyvinyl alcohol
SAS	Statistical Analysis Software
SEM	Scanning electron microscopy
TBS	Tris-buffered saline
TSD	Tratamento seletivo direcionado

LISTA DE TABELAS

Manuscrito 1

Table 1 – EC50 (mg/mL) and 95% confidence intervals (CI) of *Pleurotus ostreatus* AE on *Haemonchus contortus* Egg hatch test (EHT), Larval development test (LDT) and Larval migration test (LMT).....62

Manuscrito 2

Table 1 – Nanospheres characterization.....86

LISTA DE FIGURAS

Manuscrito 1

Figure 1 - Chromatographic profile obtained by GS from AE of *Pleurotus ostreatus*. The peaks (1-5) indicate the profile of fatty acids.....64

Figure 2 - Mean efficacy (\pm SD) of *Pleurotus ostreatus* AE in *Haemonchus contortus* *in vitro* tests: A - Egg Hatching Test (EHT); B - Larval Development Test (LDT); C - Larval Migration Test (LMT), and *in vivo* test: D - Worm load (\pm SD) recovered of *Meriones unguiculatus* experimentally infected with *H. contortus* and treated with *Pleurotus ostreatus* AE.....65

Manuscrito 2

Figure 1 – Scanning electron photograph of the nanospheres. A - no-loaded PLGA 50:50 nanospheres; B - loaded PLGA 50:50 nanospheres with IgY/anti-*Haemonchus* ; C - No-loaded PLGA 82:18 nanospheres ; D - loaded PLGA 82:18 nanospheres with IgY/anti-*Haemonchus*.....87

Figure 2 – *In vitro* release profile of IgY/anti-*Haemonchus* from PLGA 50:50 and 82:18 nanospheres.....88

Figure 3 – Serum IgY antibodies after subcutaneous application with 2 mg of IgY/anti-*Haemonchus* free and nanoencapsulated with PLGA 50:50 and 82:18.....89

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	DESAFIO: <i>Haemonchus contortus</i>	27
2.2	AVANÇOS NO CONTROLE DO <i>Haemonchus contortus</i>	28
2.3	COGUMELOS NO CONTROLE DE NEMATÓIDES.....	33
2.3.1	<i>Pleurotus ostreatus</i>.....	35
2.4	IMUNOGLOBULINA Y.....	38
2.4.1	Potencial terapêutico da IgY.....	39
2.5	LIBERAÇÃO CONTROLADA DE MOLÉCULAS COM POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS.....	40
2.5.1	Poli ácido láctico-co-ácido glicólico (PLGA).....	41
3	MANUSCRITO I.....	43
4	MANUSCRITO II.....	66
5	DISCUSSÃO.....	90
6	CONCLUSÕES.....	91
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

1 INTRODUÇÃO

A produção animal em países tropicais desempenha um papel fundamental no fornecimento de proteínas de elevado valor biológico para as populações locais. Nos próximos anos, a produção animal enfrentará dois grandes desafios: o aumento da população humana e a necessidade crescente de reduzir a utilização de drogas sintéticas no controle de pragas (CELI et al., 2017; GOMIERO; PIMENTEL; PAOLETTI, 2011). Com isso, a demanda por produtos de origem animal aumentará junto com a necessidade de métodos de controle ambientalmente seguros (NARDONE et al., 2010). Aliado a isso, a produção de pequenos ruminantes é considerada uma atividade agropecuária viável em regiões tropicais e subtropicais, sobretudo devido à capacidade dos animais em se adaptarem as condições adversas, a facilidade de manejo e alta capacidade de conversão alimentar em proteína animal (PEACOCK; SHERMAN, 2010). Simultaneamente, problemas de ordem sanitária se tornarão mais frequentes, proporcionando desafios adicionais que devem ser controlados (ROBLES, 2017).

Alguns fatores afetam sobremaneira a regularidade e qualidade dos produtos derivados de pequenos ruminantes, com destaque para os problemas sanitários causados por infecções gastrintestinais provocadas por nematoides (TARIQ, 2015). Essas infecções são frequentemente mistas e incluem espécies como *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides papillosus*, *Oesophagostomum* spp (VIEIRA et al., 2014). Entre os parasitos de maior importância destaca-se *H. contortus*, por ser uma espécie de alta patogenicidade, devido a seu hábito alimentar hematófago e elevado potencial biótico. A gravidade da infecção por *H. contortus* está relacionada à carga parasitária existente que pode em algumas circunstâncias ser fatal (TAYLOR, 2007). Embora seja originalmente um parasito tropical, esse nematoide tem se destacado em diversas partes do mundo e é prevalente em regiões dos hemisférios sul e norte, atingindo o círculo polar ártico (FALZON et al., 2013).

Os fármacos anti-helmínticos são frequentemente usados para o controle de infecções por nematoides gastrointestinais em ruminantes (MOLENTO et al., 2011). Porém, a resistência dos nematoides as classes de antiparasitários têm sido observadas em rebanhos de caprinos e ovinos (DOMKE et al., 2013). O uso contínuo dos anti-helmínticos, muitas vezes em dosagens inadequadas e com alta frequência de tratamentos, acelerou o processo de resistência anti-helmíntica, cujos relatos são contínuos em diversas partes do mundo (CHANDRAWATHANI; ADNAN; WALLER, 1999; CINTRA et al., 2016; LIMA et al., 2010; MELO et al., 2003; RODRIGUES et al., 2007; TERRILL et al., 2001). Graças ao uso em excesso e sem eficácia desejada, a quantidade de antiparasitários tem aumentado os custos de produção animal. No

Brasil, dados mais recentes mostram que o volume comercializado de fármacos parasiticidas para ruminantes chega a 540 milhões de reais por ano (SINDAN, 2014). Além disso, essa alternativa aumenta a presença de resíduos dos fármacos na carne e no leite, o que preocupa o consumidor moderno, que passou a optar por alimentos com quantidades mínimas de intervenções químicas e que não tenham efeitos deletérios para o meio ambiente (KNOX; TORRES-ACOSTA; AGUILAR-CABALLERO, 2006).

Considerando as informações apresentadas anteriormente, fica evidente que medidas capazes de reduzir a carga parasitária dos animais, contaminação das pastagens e consequentemente a quantidade de resíduos dos fármacos sintéticos nos produtos e meio ambiente, trazem grandes benefícios para a produção de pequenos ruminantes. Dessa forma, medidas de controle como as abordagens fitoterápicas e de efeito imunoterápico podem ser exploradas afim de se tornarem alternativas viáveis no controle da hemonose. Com isso, essa tese tem a finalidade de abordar alternativas no controle de *H. contortus*, com os seguintes objetivos: (1) investigar os efeitos do extrato aquoso do cogumelo *Pleurotus ostreatus* (variedade branca do cogumelo ostra) *in vitro* e *in vivo* em diferentes estágios de desenvolvimento de *H. contortus*; (2) investigar as características físicas de diferentes formulações de nanosferas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), bem como sua capacidade de reter e distribuir *in vitro* e *in vivo* anticorpos IgY anti-*H. contortus*. A seguir é apresentada uma revisão de literatura para contextualização do assunto e os resultados desses estudos estão expostos em forma de artigos distribuídos em dois capítulos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O DESAFIO: *Haemonchus contortus*

A hemoncose assume grande importância na produção de pequenos ruminantes em diversas partes do mundo, pois causa impacto direto na cadeia produtiva e conseqüentemente podem inviabilizar a atividade (RINALDI; VENEZIANO; CRINGOLI, 2007). Isso se deve a ação do parasito que causa espoliação sanguínea no abomaso, disfunções na absorção de nutrientes e principalmente anemia. Dessa forma, os animais são afetados no consumo alimentar, ganho de peso e rendimento de carcaça, assim como na produção lã e leite (LAGARES, 2008).

H. contortus é um parasito que possui entre 2-3 cm na fase adulta. As fêmeas são ovíparas com alta prolificidade e possuem características morfológicas específicas que determinam sua presença no abomaso, como os ovários em espirais envoltos pelo intestino repleto de sangue que criam um aspecto de poste de barbeiro (Barberworm). O ciclo do parasito é direto dividido em duas fases: vida parasitária e livre. Na fase de vida parasitária, após a cópula, as fêmeas liberam os ovos no interior do abomaso que são excretados com as fezes para o ambiente. Em condições ideais de temperatura (18-26°C) e umidade (80-100%) as larvas eclodem e se desenvolvem nos estágios de L1 a L3 no interior das fezes em 5-7 dias (BOWMAN; LYNN; EBERHARD, 2010). Em horários de pouca incidência solar, as larvas infectantes (L3) migram para as partes superiores da pastagem, sendo ingeridas pelos animais e dando início a fase de vida parasitária. Nesta fase, as larvas sofrem duas mudas (L4 e L5) em íntima aposição as glândulas gástricas do abomaso. A última muda desenvolve uma lanceta bucal que lhe concede a capacidade de hematofagia (URQUHART; ACEDO, 2001).

O hábito hematófago do nematoide e a incapacidade do hospedeiro em compensar a perda de sangue provocam alterações em diversos parâmetros sanguíneos, como redução do volume globular e das proteínas plasmáticas totais, provocando sinais clínicos característicos como edema submandibular e anemia, claramente observada na conjuntiva ocular (ONYIAH; ARSLAN, 2005). A prevalência do parasito representa mais de 80% da carga parasitária em pequenos ruminantes e geralmente podem estar presentes entre 1.000-20.000 nematoides no conteúdo e mucosa abomasal (AMARANTE, 2009; SILVA, W. W.; BEVILAQUA; RODRIGUES, 2003; URQUHART; ACEDO, 2001).

Os efeitos do parasitismo são determinados por alguns fatores, dentre esses, a espécie do hospedeiro e a carga parasitária (SANTOS, M. C.; SILVA; AMARANTE, 2012). Apesar de *H. contortus* ocorrer em ovinos e caprinos, as infecções diferem entre as espécies de hospedeiro,

sendo a maior frequência da hemoncose em caprinos. Este fato ocorre pelo hábito alimentar da espécie caprina que durante o processo inicial de domesticação, alimentavam-se exclusivamente de arbustos, sendo pouco expostos as infecções. Atualmente como grande parte da alimentação é feita em pastagens, há uma maior exposição e ainda, essa espécie animal não foi possível estabelecer uma resposta adaptativa eficiente como a encontrada em ovinos contra os nematoides (TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008).

O principal método utilizado no controle da hemoncose são os fármacos anti-helmínticos que são recomendados em diversos protocolos desenvolvidos durante anos (REIS, 2004; TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008). No entanto, alguns desses procedimentos potencializaram os avanços da resistência anti-helmíntica. A resistência pode ser ocasionada em decorrência da má utilização dos fármacos que geram uma pressão de seleção sobre os nematoides e uma progressiva diminuição da eficácia, com isso os parasitos são capazes de resistir a doses cada vez maiores de diferentes bases químicas. Diversos estudos demonstraram o avanço da resistência anti-helmíntica em diferentes partes do mundo (CAZAJOUS et al., 2018; DEY et al., 2020; SANTOS et al., 2017; LAMB et al., 2017; SCHNYDER et al., 2005). Neste contexto, alternativas de controle como os fitoterápicos, agente biológicos, manejo de pastagens, dentre outros métodos de controle integrado são estudados como formas de controlar *H. contortus*, sendo relatados como alternativas promissoras na redução das infecções e contaminação do meio ambiente pelos nematoides (ANDRE et al., 2016; FERNANDES et al., 2004; IGARASHI et al., 2013; JESUS et al., 2013).

2.2 AVANÇOS NO CONTROLE DO *Haemonchus contortus*

Entre 1960 e 1980, um sucesso extraordinário foi alcançado no desenvolvimento de fármacos anti-helmínticos para animais. Nestes 20 anos, drogas com estruturas diversas, demonstraram atividade e segurança invejável levando a enormes ganhos de produtividade. As descobertas do tiabendazol e levamisol forneceram compostos com potencial *in vivo* em mg/kg em vez de doses em gramas. No caso de tiabendazol, levou à descoberta de um grupo de análogos, os benzimidazóis, com excelente atividade de amplo espectro e segurança. Em 1981, outro importante avanço foi dado com o lançamento da ivermectina no mercado de saúde animal, que teve excelente atividade de amplo espectro contra nematoides e também foi eficaz contra vários parasitos artrópodes. No entanto, quase tão rapidamente quanto as novas descobertas estavam sendo feitas, a resistência foi relatada nos parasitos para cada grupo químico (DRUDGE, et al., 1964; BRITT, 1986; VIEIRA, et al., 1992). Isso estimulou a

pesquisa sobre os mecanismos de ação da resistência aos anti-helmínticos. Os 20 anos seguintes foram gastos refinando moléculas existentes com atividade de nicho (parasito e especificidade do hospedeiro), melhorando os sistemas de entrega, protocolos e se preocupando com a disseminação da resistência aos medicamentos (MCKELLAR; JACKSON, 2004).

Diversos protocolos foram sugeridos no decorrer de anos, dentre esses: o controle curativo baseia-se no tratamento dos animais que apresentam sintomatologia e mortes em ocasião da verminose aguda. O controle tático visa aplicação de anti-helmínticos em situações de risco como mudanças climáticas, introdução de animais no rebanho, períodos de estresse como estação de monta e periparto. Já o controle supressivo era indicado a todos os animais do rebanho ao mesmo tempo com tratamentos realizados de 14-28 dias, buscando reduzir a carga parasitária e a contaminação do ambiente (REIS, 2004; TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008). Da mesma forma o controle estratégico visava interromper o ciclo de vida dos parasitos, porém era realizado de acordo com a epidemiologia de cada região e fundamentava-se em tratar os animais em períodos que antecedem as épocas de maior incidência de verminose nos rebanhos. Ambos, controle supressivo e estratégico não são mais recomendados por acelerarem o aparecimento da resistência anti-helmíntica (REIS, 2004).

Diante do avanço da resistência anti-helmíntica, diversas estratégias estão sendo desenvolvidas ou aplicadas no controle do *H. contortus* (SELEMON, 2018). Destacam-se ainda a utilização de fármacos sintéticos, mas de forma racional. O método FAMACHA® busca avaliar os sinais visíveis de anemia como um indicador de diagnóstico simples e rápido através da avaliação da cor da conjuntiva ocular (MAIA et al., 2014; VAN WYK; BATH, 2002). Os animais são examinados e avaliados conforme um cartão contendo um conjunto de cinco cores que variam de vermelho-rosa (normal) a branco (anemia terminal) identificando quais animais necessitam de tratamento de forma individual. Dessa forma, busca-se reduzir a pressão de seleção da resistência anti-helmíntica imposta pelo tratamento usual e frequente de todos os animais. Essa abordagem requer avaliações frequentes para garantir a detecção e o tratamento precoce de animais com hemonose clínica e subclínica, com um cronograma recomendado de inspeções em intervalos de 15 a 30 dias (MAIA et al., 2015; MOLENTO, M B et al., 2013). No entanto, é necessária uma contribuição significativa de mão-de-obra, sendo considerado viável quando o número de animais é pequeno ou há trabalhadores suficientes disponíveis (RINALDI; CRINGOLI, 2012). Além de uma redução drástica na proporção de tratamentos anti-helmínticos administrados (ARECE-GARCÍA et al., 2014), os animais reincidentes podem ser identificados e descartados, pois há uma alta herdabilidade em ovinos (RILEY; VAN WYK, 2009) e caprinos sensíveis aos nematoides gastrointestinais (MAHIEU et al., 2007).

Outra abordagem de redução no uso de fármacos sintéticos é a manutenção da refugia. A definição mais simples para uma população em refugia refere-se às subpopulações em estágios parasitários no hospedeiro ou estágios de vida livre na pastagem que não são expostos ao tratamento anti-helmíntico (NIELSEN et al., 2014). A principal justificativa para a manutenção efetiva da suscetibilidade anti-helmíntica através da exploração da população em refugia é que os parasitos devem completar seu ciclo de vida e passar alelos suscetíveis aos antiparasitários para a próxima geração de nematoides (KENYON et al., 2009). Essa estratégia propõe que a refugia seja incorporada mais amplamente ao uso racional de anti-helmínticos como forma de retardar a propagação da resistência. Isso geralmente depende do tratamento de apenas uma parte dos animais do rebanho, sendo recomendadas práticas que promovam o tratamento seletivo direcionado (TSD), deixando parte da população de nematoides sem tratamento e, portanto, livre da pressão de seleção aplicada pela exposição aos fármacos (MUCHIUT et al., 2018). A mistura de nematoides resultante de genótipos resistentes e suscetíveis nas pastagens deve permitir o potencial de cruzamento e diluir a frequência de genótipos resistentes em uma população do parasito (PARK et al., 2015). O sucesso do controle baseado em refugia depende de muitos fatores; desde do nível de resistência às classes farmacológicas antiparasitárias existente na população, diversidade genética da população de nematoides, proporção da população de helmintos expostos ao medicamento e a eficácia e frequência do tratamento com fármacos específicos (BESIER, 2012). Além disso, é necessária uma compreensão de fatores ambientais, como o clima e seus efeitos na sobrevivência de populações de parasitos na forragem e práticas de manejo de hospedeiros e pastagens. Ou seja, a abordagem pode variar de acordo com a características climáticas de cada região (HODGKINSON et al., 2019).

Embora a dependência de anti-helmínticos como principal forma de controle de helmintos não seja sustentável, compreende-se a relutância de muitos produtores em reduzir o excesso de tratamentos, a menos que se confirme que outras alternativas são eficazes. Com isso, foi demonstrado que estratégias integradas reduzem com sucesso a necessidade do uso de anti-helmínticos, diminuindo a exposição dos antiparasitários ao desafio de *H. contortus* e aumentando a resistência ou resiliência do hospedeiro (KEARNEY et al., 2016; TERRILL et al., 2012). Quando as estratégias são associadas e com monitoramento adequado das infecções por *H. contortus*, essas alternativas oferecem uma perspectiva de redução sustentada tanto do uso dos anti-helmínticos, quanto ao risco de surtos de hemoncose (SINGH, D.; SWARNKAR, 2012; TORRES-ACOSTA et al., 2014).

Entre as abordagens não químicas, um dos principais métodos de controle são o manejo nutricional e seleção genética. Boas condições nutricionais melhoram a capacidade dos animais em resistir à infecção por nematoides, com respostas positivas demonstradas tanto pela resistência, quanto pela resiliência ao *H. contortus* (HOSTE, et al., 2016). A tolerância à infecção por *H. contortus* é significativamente reduzida quando são ofertados aos ovinos concentrados de baixa proteína em comparação com animais suplementados, embora a melhoria da nutrição não possa resultar necessariamente em cargas mais baixas de *H. contortus* (KHAN et al., 2012). A necessidade de uma adequação nutricional causa impactos substanciais na reversão da redução na ingestão de alimentos e na digestibilidade, bem como a reorientação do uso de nutrientes para reparar tecidos danificados, principalmente mucosa abomasal (SINGH et al., 2015). Além disso, a nutrição fornece nutrientes que interagem com a função imunológica (MACARTHUR; KAHN; WINDON, 2013). A estratégia nutricional é um aspecto importante do controle integrado contra os nematoides gastrintestinais e quando planejadas com base na epidemiologia dos nematoides e combinadas com outras estratégias podem garantir o controle adequado de helmintos (TARIQ, 2015).

A seleção genética de animais resistentes a infecções de *H. contortus* é baseada nas características do hospedeiro em suportar os efeitos do parasito. Desta forma o organismo desses animais é capaz de impedir a invasão e eliminar os nematoides (SADDIQI, et al., 2011). Os programas de melhoramento para seleção de animais resistentes aos nematoides gastrointestinais são uma estratégia de longo prazo que requer investimento consistente em manutenção de registros em relação aos níveis de infecção, frequência do tratamento anti-helmíntico, suscetibilidade à infecção e score FAMACHA[®] (MCMANUS et al., 2014). Animais exibindo consistentemente altas contagens de ovos e baixo desempenho em resposta à infecção, uma vez identificados, podem ser removidos do rebanho. Esses animais com altas cargas de parasitos gastrointestinais elevam a contaminação das pastagens, aumentam o desafio para outros animais, comprometendo a saúde de todo o rebanho (MOLENTO; BUZATTI; SPRENGER, 2016). Diversos pesquisadores têm procurado marcadores genéticos associados à resistência do hospedeiro como uma estratégia para combater os problemas contra o parasito (GUO et al., 2016; REYES et al., 2016; SADDIQI et al., 2010). Com esses marcadores os programas de seleção poderiam ser mais eficazes e diretos. Usando marcadores de DNA, amostras de sangue ou tecido poderiam ser coletadas de animais e a seleção realizada com base em seus genótipos (BENAVIDES; SONSTEGARD; VAN TASSELL, 2016).

As vacinas são consideradas outra alternativa favorável na prevenção de doenças parasitárias, pois podem proporcionar uma proteção de anticorpos duradoura e não impactam

na deposição de resíduos químicos em produtos de origem animal e no meio ambiente (PARIZI et al., 2012). O princípio da vacinação é induzir uma resposta imunológica em um hospedeiro contra uma infecção subsequente. Para isso, o sistema imunológico pode ser estimulado com o patógeno atenuado de forma total ou parcial, morto ou expostos a proteínas/antígenos, as denominadas vacinas de subunidade (GERDTS, 2015). As vacinas de subunidades podem ser baseadas em um único antígeno ou em uma mistura de antígenos, que podem ser purificados dos parasitos ou produzidos através da tecnologia de DNA recombinante (MOYLE; TOTH, 2013). Neste contexto, uma vacina contra *H. contortus* baseada em uma mistura de antígenos da membrana intestinal do nematoide foi recentemente registrada e atualmente é comercializada na Austrália e África do Sul para ovinos (Barbervax[®], Wirevax[®]) (MATOS et al., 2017; SMITH; PETTIT; SMITH, 2001). A vacinação com essa combinação de antígenos mostrou reduções na contagem de ovos nas fezes (> 80%), com reduções simultâneas de anemia e mortes de ovinos (BASSETTO et al., 2014). A vacina também conferiu proteção contra *Haemonchus placei* em bezerros em pastejo, mas ainda não foi registrada para uso em bovinos (BASSETTO et al., 2011). Todavia, a vacinação de caprinos não protegeu suficientemente contra infecções por *H. contortus* (MATOS et al., 2017; MEIER; TORGERSON; HERTZBERG, 2016). Muitos esforços foram elaborados para identificar e expressar uma variedade de antígenos de *H. contortus*, mas a maioria das proteínas recombinantes não teve sucesso na obtenção de imunidade protetora (CACHAT et al., 2010). Recentemente, um gene que codifica um antígeno somático Hc23 foi identificado e expresso em *Escherichia coli*. Os cordeiros vacinados com o antígeno Hc23 recombinante foram significativamente protegidos à infecção artificial por larvas de *Haemonchus*, com redução de mais de 80% de ovos do helminto encontrados nas fezes e na carga parasitária, em comparação com os grupos controles desafiados (FAWZI et al., 2014).

O potencial do controle biológico para complementar o uso de fármacos anti-helmínticos levou a um volume considerável de pesquisas ao longo de anos, especialmente sobre o possível papel de pastagens com ação bioativa e fungos nematófagos (SANDOVAL-CASTRO et al., 2012; SILVA et al., 2017). Um grande número de espécies de plantas presentes no pasto possui produtos bioativos, especialmente os compostos fenólicos de taninos condensados, que podem reduzir a carga de nematoides e melhorar o desempenho produtivo dos animais (HOSTE et al., 2012). Da mesma forma, o efeito de fungos que habitam de forma natural o solo e pasto têm sido explorados para aplicação oral nos animais, de modo que estes passem para as fezes, onde se desenvolvem e antecedem as larvas infectantes (SODER; HOLDEN, 2005). Esses fungos capturam e destroem o desenvolvimento das larvas nas fezes, produzindo uma variedade de

estruturas de captura, como anéis constritores, anéis não constritivos, botões adesivos, hifas adesivas, ramos adesivos e redes adesivas no micélio (KARAKAŞ, 2020). Sugere-se que através da alimentação contínua de animais por fungos será alcançado um efeito epidemiológico devido à eliminação dos parasitos no ambiente através das fezes e com isso haverá uma redução dos nematoides no ambiente e conseqüentemente uma diminuição da ingestão de larvas na pastagem (JOHNSON et al., 2010). Várias espécies de fungos possuem atividade contra larvas de nematoides de ruminantes (BALOYI; LAING; YOBO, 2012), com pesquisas direcionadas principalmente com *Duddingtonia flagrans* (ASSIS et al., 2013; SAGÜÉS et al., 2011), embora exista a busca por mais espécies candidatas. Alguns resultados promissores, embora variáveis, foram mostrados em estudos a campo em diferentes ambientes com ovinos (SILVA et al., 2010) e caprinos (VILELA et al., 2012), inclusive contra *H. contortus*.

2.3 COGUMELOS NO CONTROLE DE NEMATOIDES

O uso de fungos nematófagos como controle biológico é uma alternativa amplamente investigada que vem sendo comercializada em muitos países (RADDY et al., 2013) e um considerável número de pesquisas investiga a ação de fungos comestíveis como os cogumelos, por apresentarem diversas propriedades medicinais, incluindo atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral (STAMETS, 2014). Embora exista uma grande diversidade de cogumelos, nem todos são comestíveis e apenas alguns são cultivados comercialmente. O número de espécies de cogumelos comestíveis cultivados no mundo varia de 92 a 130 espécies (BOA, 2004). Assim, existe uma ampla oportunidade para investigar os diferentes efeitos com o objetivo de encontrar compostos químicos que possam ser utilizados como alternativas para o controle de doenças parasitárias. A busca pelo uso potencial dos compostos nematicidas de diferentes espécies de cogumelos inclui estudos utilizando nematoides de vida livre e atividade contra nematoides parasitos de plantas em condições *in vitro* (SOARES et al., 2019; WILLE et al., 2019). Mais recentemente, diferentes compostos derivados de cogumelos começaram a ser investigados quanto à sua atividade nematicida contra estágios larvais de parasitos de ruminantes (VIEIRA et al., 2017).

Estudos utilizando nematoides de vida livre são muito úteis para realizar a triagem inicial e a seleção de produtos derivados de cogumelos como possíveis candidatos a serem avaliados posteriormente contra nematoides de plantas ou animais. Atividade nematicida *in vitro* de *Pleurotus pulmonarius* e *Hericium coralloides* foi demonstrada em *Caenorhabditis elegans* (STADLER et al., 1994). Vários compostos apresentaram atividade nematicida, sendo o ácido S-coriólico e ácido linoléico os compostos com maior atividade. A utilização de extrato aquoso de *Pleurotus eryngii* reduziu significativamente o número de larvas

de *Panagrellus* sp. (60% e 90%), após 24 e 48 horas de exposição, respectivamente (SUFIATE et al., 2017). O efeito nematicida do extrato não estava relacionado a atividade enzimática de proteases, mas a presença de outros metabólitos. Um estudo recente, avaliou um extrato obtido de *Hypsizygus marmoreus* com uma redução de 52% na população de *Panagrellus redivivus*, atribuída a atividade de proteases produzida pelo extrato (SOARES et al., 2019). Além disso, o extrato bruto e bruto fervido de *Flammulina velutipes* demonstraram potencial nematicida reduzindo a população de larvas de *Panagrellus* sp. Os autores sugeriram que a atividade foi atribuída a enzimas proteolíticas e outros metabólitos (FERREIRA et al., 2019).

Dentre os relatos mostrando a atividade de cogumelos comestíveis contra nematoides de plantas, um estudo utilizando *Coprinus comatus* no nematoide de raízes *Meloidogyne arenaria* demonstrou que os helmintos foram paralisados em 95,8% em um período de 8h de exposição. Da mesma forma, o micélio de *Stropharia* sp. foi avaliado em larvas do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* (KONG et al., 2013). Os nematoides foram expostos e obteve-se 100% de mortalidade após 36 horas de exposição. A atividade ovicida de micélios de *P. eryngii* foi avaliada contra *Meloidogyne javanica*, resultando em 53% de eficácia, atribuída à protease fúngica e ação da quitinase (SUFIATE et al., 2017). Da mesma forma, o micélio do fungo *Pleurotus cystidiosus* foi estudado e demonstrou a presença de toxocistos após ser submetido a testes com o nematoide *Bursaphelenchus xylophilus* (TRUONG et al., 2007). Em outro estudo, uma fração acetônica obtida de *P. ferulae* foi avaliada *in vitro* buscando atividade nematicida e potenciais compostos contra o nematoide *B. xylophilus* que afeta a madeira de pinheiros. A atividade observada foi associada a um composto principal identificado como 5-hidroximetil-furancarbaldeído (LI, et al., 2007).

Existem poucos estudos avaliando a atividade nematicida *in vitro* de produtos obtidos de cogumelos comestíveis contra nematoides de ruminantes. Um dos estudos mostrou que o micélio de *P. pulmonarius* teve um efeito imobilizador contra populações larvares pré-infectantes de *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia oncophora*, *Oesophagostomum quadrispinulatum* e *Cyathostoma* sp. O fungo demonstrou um forte efeito *in vitro* de imobilização contra os estágios pré-infectantes quando comparado às larvas infectantes (L3) (LARSEN; NANSEN, 1991). Em outro estudo, foram avaliados os extratos aquosos obtidos de corpos de frutificação de *Agaricus blazei* contra ovos de *H. contortus*, obtendo-se 100% de eficácia na inibição da eclosão de ovos com concentração de 3,62 mg/mL após 72 h de exposição (VIEIRA et al., 2017). Da mesma forma, um extrato hidroalcoólico dos corpos de

frutificação de *P. djamor* foi avaliado contra ovos e larvas infectantes de *H. contortus*, uma das frações obtidas apresentou inibição da eclosão em 100% dos ovos com concentração de 10 mg/mL após 72 h de exposição. Essa fração também mostrou atividade larvicida de 90,6% a 40 mg/mL após 72 h de exposição. Os compostos identificados na fração bioativa foram 4 ácidos graxos: pentadecanóico, hexadecanóico, octadecadienóico e ácido octadecanóico e um terpeno identificado como β - sitosterol. Essa fração de terpeno mostrou-se ativa contra ovos de *H. contortus* (PINEDA-ALEGRÍA et al., 2017). Outro estudo avaliou a atividade *in vitro* de extratos etanólicos de sete linhagens de *P. eryngii* contra ovos e larvas de *H. contortus* (CRUZ-AREVALO et al., 2018). Esses extratos causaram baixa mortalidade larval (11,55 a 18,83%) na concentração de 20 μ g/mL. No entanto, quando o extrato de *P. eryngii* foi fracionado (frações F1 a F5), encontraram uma alta atividade ovicida de 91,87% a 40 mg/mL. A análise em cromatografia gasosa dessa fração mostrou a presença de trealose, polióis (L-iditol, galactitol, D-manitol, D-glucitol e mioinositol), ácido adípico, ácido esteárico, esqualeno e β - sitosterol, que poderiam ser responsáveis pela atividade (CRUZ-AREVALO et al., 2018). Finalmente, moléculas puras (ácido pentadecanoico, ácido palmítico, β - sitosterol, ácido esteárico e ácido linoleico) previamente relatadas nos fungos foram avaliadas contra ovos e larvas de *H. contortus* (PINEDA-ALEGRÍA et al., 2017). O ácido palmítico e esteárico inibiu a eclosão de ovos em 100% a 20 mg/mL. No entanto, a combinação dos dois compostos mostrou inibição na eclosão de ovos em 70 a 100%. Por outro lado, no teste de mortalidade larval, a combinação dos cinco compostos mostrou mortalidade de 100% a 20 mg/ml após 24 h de exposição. Assim, a atividade encontrada com a combinação de moléculas presentes nos fungos sugere atividade sinérgica (PINEDA-ALEGRÍA et al., 2020).

Apenas um único estudo avaliou o potencial efeito do extrato de cogumelos em ovinos. Nesse estudo avaliou-se o consumo do corpo de frutificação *Agaricus blazei* contra *H. contortus*. A concentração de 11,4 g/kg foi disponibilizada durante 2 dias consecutivos aos cordeiros, observou-se inicialmente uma redução de ovos por grama de fezes (OPG) em relação a eliminação em animais não tratados. Após o consumo por 14 dias, a redução do OPG não foi significativa (VIEIRA et al., 2017).

2.3.1 *Pleurotus ostreatus*

O cogumelo da espécie *P. ostreatus*, um fungo pertencente a classe dos basidiomicetos, é também conhecido popularmente como cogumelo ostra, hiratake ou shimeji (SÁNCHEZ,

2010). Esta espécie cresce naturalmente em climas temperados e é capaz de resistir uma ampla variação térmica, que facilita seu cultivo em várias regiões (MILES; CHANG, 2004). É um dos cogumelos mais cultivados no mundo, utilizado como alimento ou suplemento com excelentes propriedades nutricionais. Contêm proteínas, carboidratos, gorduras, fibras, vitaminas, minerais e metabólitos secundários. Além disso, seu beta-glicano pode estimular o sistema imunológico com bons resultados no combate ao câncer, infecções microbianas e diabetes (MOWSURNI; CHOWDHURY, 2010). O cogumelo ostra é utilizado em diversos processos biotecnológicos, incluindo processos de biodigestão anaeróbica, bioremediação, corante industrial e tratamento de efluentes por ação enzimática (DESHMUKH; KHARDENAVIS; PUROHIT, 2016).

A atividade de cogumelos comestíveis contra algumas espécies de nematoides foi demonstrado principalmente utilizando espécies do gênero *Pleurotus* spp. Esses cogumelos possuem a capacidade de produzir pequenas gotículas a partir de estruturas em seu micélio, que supostamente contém nematotoxinas (KWOK et al., 1992). Quando os nematoides entram em contato com essas gotículas, sofrem alterações principalmente na região da cabeça, causando o deslocamento do esôfago ou alteração dos tecidos ao seu redor (THORN; BARRON, 1984). Estudos recentes mostram que as substâncias que afetam os nematoides são produzidas ou estão presentes em estruturas especializadas diferenciadas morfológicamente, conhecidas como toxocistos (ARMAS-TIZAPANTZI et al., 2019). As toxinas e ácidos graxos presentes nessas estruturas possuem a capacidade de paralisar os nematoides, permitindo a aderência do fungo à bainha e a degradação da mesma para obtenção de nutrientes (HEYDARI; POURJAM; GOLTAPPEH, 2006).

Um dos primeiros estudos que avaliaram a atividade nematicida de extratos de *P. ostreatus* contra o nematoide de vida livre *Panagrellus* sp. demonstrou 95% de atividade nematicida após 1 h de exposição em avaliação *in vitro*, resultado atribuído ao efeito de um composto identificado como ácido trans-2-decenodióico (KWOK et al., 1992). Da mesma forma, extratos acetônicos e metanólicos obtidos do corpo de frutificação de *P. ostreatus* foram avaliados *in vitro* contra o nematoide *P. redivivus*. Altas taxas de mortalidade (80 e 92%) foram registradas, respectivamente (ALDAZ-MERCHÁN, 2018).

Enquanto isso, foram estudados os efeitos antagônicos *in vitro* de cinco espécies de *Pleurotus* (*P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *P. cornucopiae*, *P. florida* e *P. eryngii*) contra larvas de segundo estágio de *M. javanica*. Todas as espécies testadas produziram pequenas gotículas de toxina (HEYDARI; POURJAM; GOLTAPPEH, 2006). Os nematoides que

entraram em contato com as gotículas paralisaram e foram colonizados pelos fungos após 24-48 h, principalmente na região oral. Esses efeitos foram mais evidentes para *P. ostreatus*. Todos os filtrados dos fungos testados foram tóxicos para os nematoides, mas os filtrados de *P. ostreatus* apresentaram a maior atividade nematicida contra *M. javanica*. Contudo, o extrato etanólico e aquoso de *P. ostreatus* também foi avaliado contra *Meloidogyne* spp., e obteve mortalidade de 99,1% para o extrato etanólico e 1,4% para o extrato aquoso após 60 minutos de exposição (ALVEAR-DÍAZ, 2018). Extratos acetônico e metanólico obtidos do corpo de frutificação de *P. ostreatus* foram avaliados *in vitro* contra o nematoide *Ditylenchus dipsaci* e após 1 h, foram observadas 95 e 84% de mortalidade respectivamente (ALDAZ-MERCHÁN, 2018).

Em um experimento utilizando um extrato hidroalcólico obtido de micélios de *P. ostreatus* causou 100% da taxa de inibição dos ovos de *H. contortus* a 1,25 mg/mL após 72 h de exposição. Os autores também relataram vários metabólitos presentes na fração bioativa, incluindo quatro ácidos graxos: (i) ácido hexadecanóico, (ii) ácido octadecanóico, (iii) etanol 2-butoxi fosfato e (iv) etanol 2-butoxi fosfato (3: 1) e um açúcar xilitol (CEDILLO, 2016). Um estudo *in vitro* recente avaliou os extratos aquosos e etanólicos obtidos de micélios de *P. ostreatus* contra uma espécie de nematoide parasito de coelhos (*Passalurus* sp.) Em concentrações de 75% do extrato a mortalidade foi de 99,10% aos 60 minutos (ALVEAR-DÍAZ, 2018).

A avaliação da atividade de cogumelos comestíveis e de suas moléculas ativas podem levar a descoberta de novas moléculas que podem reduzir o uso dos fármacos sintéticos atualmente utilizadas (VUORELA et al., 2004). Dessa forma, a busca por metabólitos secundários com atividade antiparasitária possui grande importância para a produção agropecuária (VILLALBA et al., 2010). O uso de extrato de cogumelos e seus produtos (micélio, corpos de frutificação e substrato degradado) para o controle de nematoides de animais não tem sido amplamente explorado e vale ressaltar que os resíduos agroindustriais derivados do cultivo de cogumelos são atualmente considerados apenas um resíduo (SARDAR et al., 2017). Para tirar proveito dessa situação para um propósito benéfico, é importante explorar sua aplicação potencial como fonte natural de compostos ativos que podem se tornar ferramentas valiosas para o controle de nematoides que afetam a produção agropecuária.

2.4 IMUNOGLOBULINA Y

A resposta imune humoral é a uma das principais formas de combate a patógenos de vertebrados, sendo o processo de produção de imunoglobulinas um mecanismo de defesa sempre que o indivíduo se depara com agentes estranhos (SAMPAIO, 2014). A imunoglobulina Y é o isotipo predominante de imunoglobulinas de baixo peso molecular em anfíbios, répteis e aves, sendo o principal anticorpo produzido por galinhas (*Gallus domesticus*). Depois que seu gene é rearranjado em células B, a IgY é continuamente sintetizada, secretada no sangue e transferida para a gema do ovo, onde é acumulada (WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995). Esse anticorpo é produzido por galinhas para proporcionar as proles uma imunidade humoral eficaz contra os patógenos aviários mais comuns, até a completa maturação de seu próprio sistema imunológico. Nas galinhas, apenas três classes de imunoglobulinas foram bem identificadas (IgM, IgA e IgY) (SAMPAIO, 2014). A IgY embora prevalente no sangue circulante (5–7 mg/ml de soro) e na gema do ovo (100 mg/gema), também é encontrada no conteúdo duodenal, secreções traqueais e fluido seminal (LESLIE; CLEM, 1969). Essa imunoglobulina é composta de duas cadeias, L (“light” - 18,660 kDa) e H (“heavy” 65,105 kDa), com massa molecular levemente mais alta (aproximadamente 167 kDa) do que IgG de mamífero (SUN et al., 2001). Embora tenham características e funções semelhantes, as duas imunoglobulinas possuem estruturas ligeiramente diferentes, que fornecem propriedades e comportamentos bioquímicos distintos (SUN et al., 2001). As regiões Fab da IgY, semelhantes as imunoglobulinas de mamíferos, contém locais de ligação ao antígeno, enquanto a região Fc contém os domínios responsáveis pela ativação do complemento, opsonização e sensibilização de mastócitos para reações anafiláticas. Em aves ansiformes, como os patos, existem além da IgY, uma versão alternativa denominada de IgY Δ Fc. Esta variante não possui a região Fc, portanto, não possui as funções efetoras secundárias e é encontrada em quantidades relativamente menores (1 a 3 mg/ml) (LUNDQVIST et al., 2006).

A IgY é uma alternativa de baixo custo para produção de anticorpos policlonais. De uma forma geral, muitos antígenos podem ser utilizados para produzir IgY antígeno-específico, tais como: proteínas, toxinas, polipeptídios, hormônios, bactérias, vírus, parasitos, fungos, dentre outros (SCHADE et al., 2005). O processo de aplicação de antígenos nas aves e purificação de anticorpos da gema do ovo evita o sangramento dos animais, estresse e permite a colheita de grandes quantidades de anticorpos (GASSMANN et al., 1990). Para imunização, as galinhas são injetadas com antígenos específicos por via intramuscular por vários intervalos. Com isso, os anticorpos são transferidos por imunidade passiva das galinhas para a prole através do estágio

latente do ovo. Cerca de 4-6 dias após a inoculação, a IgY pode ser detectada na gema (PATTERSON et al., 1962). A dose de antígeno influencia significativamente a resposta imune e o volume das administrações pode variar entre 0,5 a 1 ml, preferencialmente aplicado no musculo peitoral (SAMPAIO, 2014). De acordo com Chang et al. (1999) os antígenos aplicados via intramuscular resultam em maior quantidade de anticorpos ao contrário da imunização subcutânea. As aplicações podem ser feitas em intervalos de 2 a 8 semanas e o número de imunizações depende da quantidade de interesse dos anticorpos (SAMPAIO, 2014). Através de imunização renovada, a concentração de anticorpos pode ser fortemente aumentada e a quantidade de IgY transferida independe do tamanho do ovo (PATTERSON et al., 1962). No entanto, este resultado depende de alguns fatores: tipo de antígeno, dose, peso molecular, adjuvante, genética do animal e tipo de criação (GASSMANN et al., 1990).

A extração sempre inicia pela separação da gema e da clara. Dessa forma, para separar a fase aquosa da gema utilizam-se substâncias hidrófilas, solventes orgânicos ou congelamento a -20°C (STAAK et al., 2001). Dentre os principais formas de extração e purificação da IgY, os métodos com o auxílio de polietilenoglicol (PAULY et al., 2011), sulfato de amônio ou sódio (AKITA; NAKAI, 1993; VEGA et al., 2012) técnicas cromatográficas (MEULENAER; HUYGHEBAERT, 2001) ou ultrafiltração (KIM; NAKAI, 1998) são utilizados com maior frequência. O método escolhido depende da quantidade, pureza e atividade biológica desejada, assim como do custo da técnica. Após a purificação, a IgY mostra uma elevada estabilidade ao longo de alguns meses ou anos sob diferentes condições de umidade e temperatura (SCHADE et al., 2005).

2.4.1 Potencial terapêutico da IgY

Embora seja amplamente aceito que a IgY aplicada nas superfícies das mucosas não demonstre qualquer imunogenicidade, efeitos potencialmente prejudiciais podem ser observados em organismos sensíveis as proteínas do ovo (incluindo IgY) (BERNHISEL-BROADBENT; YOLKEN; SAMPSON, 1991). No entanto, o risco em modelos animais parece ser baixo (AKITA, 1999). Algumas abordagens têm sido eficazes na redução de cargas bacterianas, parasitárias e virais em estudos em animais, bem como em ensaios clínicos de coortes em humanos (KOLLBERG et al., 2003; KRÜGER et al., 2004; LEE, S. H. et al., 2009; MALEKSHAHI et al., 2011; MULVEY et al., 2011; SAMPAIO, 2014; SARKER et al., 2001). Além de ser adequado em abordagens que visam processos infecciosos, a IgY tem sido sugerida para bloqueio, inibição e entrega em condições patológicas que exigem reagentes específicos

em quantidades substanciais (SPILLNER et al., 2012). Os anticorpos de galinhas estão bem estabelecidos como antitoxinas ou para vacinação passiva. Estudos demonstram que a IgY pode ser utilizada como antiveneno específico para neutralizar toxinas bacterianas (PAULY, et al., 2009) e ser usado para tratar picadas de cobra (ALMEIDA, et al., 1998; ARAÚJO et al., 2010; CHIOU, 2008; ALMEIDA et al., 2008; LIU; DONG; KONG, 2010; MEENATCHISUNDARAM et al., 2008b; PAUL et al., 2007). Recentemente, o uso de anticorpos de galinhas produzidos contra o nematoide *H. contortus* demonstrou resultados animadores na redução da carga parasitária em *Meriones unguiculatus* (GRESSLER, 2018).

Outras possibilidades de aplicação são exploradas, por exemplo, em testes de diagnóstico ou processos de purificação de proteínas. Uma das vantagens da IgY não ativa é que o sistema complemento não se liga às proteínas A e G, fatores reumatóides ou superfície celular (TINI et al., 2002; WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995). A distância filogenética entre mamíferos e aves causa uma alta resposta imune das aves aos antígenos dos mamíferos. Isto aumenta a especificidade de ligação da IgY, que pode ser utilizada em procedimentos de diagnóstico imunitário, como imuno-histoquímica e ELISA (SPILLNER et al., 2012).

Uma desvantagem da IgY em algumas abordagens terapêuticas ou profiláticas é sua reduzida estabilidade sob condições adversas, como em ambientes ácidos. No entanto, foi demonstrado que é possível estabilizar a resistência do pH com a ajuda de sorbitol (LEE, et al., 2002). Diferentes estratégias para melhorar a eficácia terapêutica foram desenvolvidas incluindo uma variedade de técnicas para estabilizar ou controlar a liberação dos anticorpos (KOVACS-NOLAN, 2005; LI, et al., 2009; TORCHÉ et al., 2006). Até agora, as intervenções terapêuticas mencionadas acima estão todas confirmadas com IgY nativa policlonal obtida da gema de ovo após a imunização das galinhas (SPILLNER et al., 2012).

2.5 LIBERAÇÃO CONTROLADA DE MOLÉCULAS COM POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

Os materiais biodegradáveis são de origem natural ou sintética, degradados *in vivo* ou enzimaticamente, a partir disso produz subprodutos biocompatíveis e toxicologicamente seguros, que posteriormente são eliminados pelas vias metabólicas. O número dos materiais usados na distribuição controlada de drogas, proteínas ou antígenos, aumentou drasticamente na última década. A categoria básica de biomateriais usados na entrega das moléculas pode ser amplamente classificada como: (1) polímeros sintéticos biodegradáveis, que incluem materiais relativamente hidrofóbicos, como os α -hidroxiácidos (uma família que inclui poli láctico-

coácido glicólico, PLGA), polianidridos e outros; (2) polímeros encontrados na natureza, tais como açúcares complexos (hialuronano, quitosano) e inorgânicos (hidroxiapatite) (ANDERSON, 1997; UHRICH et al., 1999). A biocompatibilidade é claramente importante, embora seja relevante observar que não é uma propriedade intrínseca de um material, mas depende do ambiente biológico e da tolerabilidade que existe em relação às interações molécula-polímero (ANDERSON; SHIVE, 1997; THAKOR et al., 2020).

2.5.1 Poli ácido láctico-co-ácido glicólico (PLGA)

O PLGA e seus derivados são polímeros alifáticos que estão disponíveis em diferentes proporções de ácido láctico e ácido glicólico de vários pesos moleculares e de tipo de grupos terminais. Os polímeros PLGA têm sido amplamente estudados nas últimas décadas para várias aplicações biomédicas devido a seus excelentes registros de segurança, variando de suturas a reconstrução óssea, bem como em implantes e partículas para administração de medicamentos (ANDERSON, 1997; JAIN, 2000). Após a sua administração, as partículas de PLGA sofrem degradação por erosão, durante a qual a água se difunde para a matriz polimérica, hidrolisando as ligações éster através do polímero e reduzindo o seu peso molecular até se formarem produtos de degradação que possam ser dissolvidos (PATRAVALE; PRABHU, 2014). Esse processo aumenta a porosidade da matriz, permitindo a liberação do material retido à medida que a degradação continua. Finalmente, o PLGA é hidrolisado nos monômeros originais, ácido láctico e ácido glicólico, que são subprodutos de várias vias metabólicas e não estão associados a significativa toxicidade (ASTETE; SABLIOV, 2006). A taxa de degradação do PLGA está relacionada ao peso molecular, hidrofiliabilidade e cristalinidade, mas também a outros fatores como pH do meio, taxa de absorção de água, processo de hidrólise do éster, razão de intumescimento e subprodutos da degradação (MOHAMMADI-SAMANI; TAGHIPOUR, 2015; PATRAVALE; PRABHU, 2014). Moléculas de baixo peso molecular degradam mais rápido, pois podem ser mais facilmente hidrolisadas e dissolvidas, deixando a matriz polimérica. Uma maior hidrofiliabilidade também pode levar a uma degradação mais rápida: a hidrofília é influenciada principalmente pela proporção de monômeros e como o ácido glicólico é mais hidrofílico do que o ácido láctico, quanto maior o conteúdo de ácido glicólico maior a taxa de hidrólise (ASTETE; SABLIOV, 2006). Uma exceção a essa regra é o copolímero com relação lactídeo:glicolídeo 50:50, que apresenta a mais rápida taxa de degradação, mesmo entre as composições poliméricas com maior teor de ácido glicólico. Isto é devido à influência da cristalinidade: quanto maior a cristalinidade, mais lenta a degradação, e na proporção de 50:50,

o polímero é o menos cristalino, resultando na maior degradação (PATRAVALE; PRABHU, 2014; ZOLNIK; BURGESS, 2007). A captação de partículas de PLGA pelas APCs pode agilizar ainda mais a degradação do polímero, pois o ambiente ácido (pH ~ 4,5-6,5) acelera a degradação em comparação com o pH fisiológico (pH 7,4), pois o baixo pH catalisa a quebra da ligação éster do esqueleto do polímero (YOO et al., 2005; ZOLNIK; BURGESS, 2007). Assim, dependendo do tipo de polímero de PLGA usado, as partículas podem ser feitas com cinética de liberação distinta (CRUZ et al., 2010; FAHMY et al., 2008; SAMADI et al., 2013).

Nanopartículas de PLGA são veículos adequados para a entrega de proteínas e peptídeos para gerar respostas imunitárias *in vivo*. Vários estudos mostraram que as nanopartículas de PLGA podem ser usadas para modular respostas imunes contra antígenos encapsulados, devido à sua capacidade no processamento adequado e apresentação de antígenos para células T (MUNDARGI et al., 2008; RAGHUVANSHI et al., 2002; SLÜTTER et al., 2009). Muitos antígenos vacinais encapsulados em nanopartículas de PLGA mostraram induzir respostas imunes amplas e potentes. Thomas et al. (2010) mostraram que o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) em MPs PLGA estimulou uma resposta de anticorpos séricos significativamente em administração pulmonar em ratos. Estudos semelhantes encapsulando antígenos da Hepatite B, mostraram que MPs induziram respostas mais fortes de anticorpos anti-HBsAg após imunização intramuscular em ratos e a imunização promoveu a secreção de IL-4, aumentou as moléculas de MHC classe II e favoreceu uma resposta Th2 (KANCHAN; PANDA, 2007). Resultados comparáveis foram obtidos com a imunização de ratos com toxóide tetânico (TT) (KATARE; MUTHUKUMARAN; PANDA, 2005).

Embora muitas propriedades sejam favoráveis e controláveis, há também desvantagens no uso de partículas de PLGA como um sistema de liberação, especialmente no que diz respeito à estabilidade das moléculas. Ainda assim, considerando que proteínas livres tem um tempo de permanência muito curto devido à degradação e liberação rápida na administração, as desvantagens são negligenciáveis comparadas à vantagem de proteção oferecido pelo encapsulamento (LELEUX; ROY, 2013; PATRAVALE; PRABHU, 2014).

3 MANUSCRITO 1

(Artigo publicado - International Journal of Medicinal Mushrooms)

**Nematocidal Effect of Oyster Culinary–Medicinal Mushroom *Pleurotus ostreatus*
(Agaricomycetes) against *Haemonchus contortus***

Antônio Francisco Igor Magalhães de Matos^{1*}, Lucas Trevisan Greesler², Marjorie
Giacometi¹, Bibiana Martins Barasuol¹, Fernando Raul Correia de Vasconcelos³, Daniel
Roulim Stainki¹, Silvia Gonzalez Monteiro^{1*}

¹ Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária,
Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Universidade de Cruz Alta, Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil.

³ Centro Universitário INTA, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Sobral, Ceará,
Brasil.

Short title: Mushroom against *Haemonchus contortus*

*Corresponding author:

Universidade Federal de Santa Maria

Av. Roraima, nº 1000, Camobi

CEP: 97105-900

Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

Phone: + 55 55 32205889

E-mail: igormagalhaes@veterinario.med.br; sgmonteiro@uol.com.br

ABSTRACT

The nematicidal effect of *Pleurotus ostreatus* (white variety of pearl oyster mushroom) aqueous extract (AE) was evaluated against *Haemonchus contortus* eggs and infective larvae (L3) *in vitro* and in artificially infected gerbils (*Meriones unguiculatus*). The chemical analyses indicated that constituents of AE are tridecanoic, tetradecanoic, linolelaidic, 9,15-octadecadienoic, and oxalic acids. *P. ostreatus* extract inhibited larval hatching by 100% at the concentration of 2.24 mg/mL and (50% effective concentration) EC₅₀ of 0.73 mg/mL. In the larval development test, AE induced a larvicidal effect at the concentration of 50 mg/mL and EC₅₀ of 17.24 mg/mL. The larval migration test revealed a reduction of 94.7% at a concentration of as low as 4 mg/mL and EC₅₀ of 1.25 mg/mL. No significant effects of treatment with *P. ostreatus* AE were seen on *H. contortus* in the gerbil model. Thus, our results demonstrate an important nematicidal *in vitro* effect of *P. ostreatus* AE against the parasite *H. contortus*. However, further investigations are necessary to confirm the anthelmintic potential of *P. ostreatus* extract in small ruminants.

KEYWORDS: biological control, gerbil, nematicidal, *Pleurotus ostreatus*.

ABBREVIATIONS

AE: aqueous extract; **EC₅₀:** 50% effective concentration; **EHT:** egg hatch test; **EI:** electron ionisation; **GC-MS:** gas chromatography - mass spectrometry; **GIN:** gastrointestinal nematode; **LDT:** larval development test; **LMT:** larval migration test; **NTA:** nematicidal activity.

I. INTRODUCTION

The production of small ruminant meat and milk is becoming increasingly important, due to both expansion of the industry and the growth of small and large producers.^{1,2} In some regions, such as the tropics, locally adapted animals serve as a viable food source to human livelihood.² However, gastrointestinal nematode (GIN) infections are prevalent parasitic diseases of sheep and goats and have a large financial impact.³ *Haemonchus contortus* is an abomasal nematode, better known as the barber's pole worm, which causes high morbidity and mortality. It is a blood-feeding worm and one of the most important small ruminant parasites. Therefore, *H. contortus* is responsible for the reduction of rural economy due to the decreased productivity caused by weight loss and anemia of the infected animals.⁴

Although *H. contortus* can be controlled using anthelmintic drugs, recent years have seen a significant increase in anthelmintic resistance, which makes the drug less effective. Furthermore, residues of anthelmintic drugs in milk, meat, and the environment are public health concerns.⁵

In this regard, there is a need to develop alternative methods to control haemonchosis and other nematodiosis, and various possibilities are currently under study.⁶⁻⁸ Among these methods, biological control is a potential alternative to chemical control because it reduces the frequency of chemical treatments, consequently diminishing the contamination of animal products and the environment.^{9,10} Although mushrooms have commonly been used by humans as food, some species have been shown to possess antitumor, hepatoprotective, immune

modulating, antiallergic, antiviral, antibacterial, antifungal, insecticidal, and antiparasitic effects.^{11–15} Mushroom species such as *Agaricus blazei* and *Pleurotus djamor* have demonstrated promising results against *H. contortus* in *in vitro* and *in vivo* assays.^{16,17} The aim of this study was to investigate the effects of *Pleurotus ostreatus* (white variety of pearl oyster mushroom) on *H. contortus* at different developmental stages.

II. MATERIALS AND METHODS

A. Fungal Material

Dried fruiting bodies of commercially available *P. ostreatus* were collected in Santa Maria, Brazil. The samples were identified and stocked at the Veterinary Parasitology Laboratory of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brazil.

B. Preparation of Mushroom Extract

Fresh fruiting bodies were dried in an oven with air circulation at $50 \pm 1^\circ\text{C}$ for approximately 24 h and ground in a blender for 2 min. The ground mushrooms were stored at 4°C . Aqueous extraction was carried out using the decoction method as described previously.^{16,18} The mushroom powder was soaked in sterile distilled water (1:25 ratio, w/v) and heated in a water bath under constant agitation at 40°C for 60 min. The mixture was then filtered through a gauze-lined glass funnel, frozen, freeze-dried (Liobras, model L101 Liotop) for 48 h, and stored at 4°C until preparation of aqueous extracts (AE) of different concentrations.

C. Chromatographic Analysis

The gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) (QP5050 - Shimadzu Corporation, Japan) apparatus in the electron ionization (EI) mode was used for compound

separation and identification. The GC-MS interface line and the ion source were maintained at 250°C. The injection was performed in splitless mode at a temperature of 240°C. Total analysis time was 80.7 min and flow rate was 13.7 mL/min. Electron energy was 70 eV and scanned mass range from 35 to 600 m/z. The separation of the compounds was performed on a Rtx-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm inner diameter, 0.25 µm film thickness; maximum temperature 370°C).¹⁹

D. Test Organism

An egg donor lamb was artificially challenged with 2000 *H. contortus* infective larvae (L3) and kept on the premises of the Veterinary Hospital of UFSM to recover *H. contortus* eggs and larvae. After 21 days, feces were collected directly from the lamb's rectum. The fecal samples were crushed, washed with tap water, and passed through a set of four sieves with openings of different sizes (1000, 105, 55, and 25 µm). The last filtrate was double centrifuged at 2500 × g for 15 min in water, and the detritus from the *H. contortus* eggs was then separated using a 60% sucrose solution density gradient. The nematode eggs were obtained from the supernatant and rinsed with sterile water to remove sucrose residues. The number of eggs was estimated using optical microscopy (Leica Microsystems, Germany). To obtain *H. contortus* larvae (L3), the donor lamb feces were incubated in glass bowls (coprocultures) at room temperature (25–28°C) for 7 days.²⁰ The animal use in this study was approved by the Ethics Committee of UFSM under the number 9243270318.

E. *In vitro* Tests

1. Egg Hatch Test (EHT)

The *in vitro* egg hatch assay was performed in 24-well cell culture plates as previously described.²¹ Four replicates were formed for each of the seven concentrations (0.28, 0.56, 0.84,

1.12, 1.4, 1.68, and 2.24 mg/mL); distilled water was used as a negative control and 0.2 µg/mL thiabendazole (Sigma, Aldrich, EUA) as a positive control. A suspension containing 120 eggs (0.25 mL of egg solution), 0.25 mL distilled water, and 0.5 mL diluted AE were deposited in each well (i.e. 1 mL per well). All experimental plates were incubated at 28°C and 60% relative humidity for 48 h. Subsequently, the egg hatching process was stopped using Lugol's solution (Sigma, Aldrich, EUA), and the samples were stored at 4°C until counting of embryonated eggs and first-stage larvae (L1) was performed under an inverted microscope (Leica Microsystems, Germany). The percentage of hatched eggs in each group was estimated using the formula: % EHT = [(number of eggs)/(number of larvae + number of eggs)]*100.

2. Larval Development Test (LDT)

The effect of *P. ostreatus* extract on larval development was investigated using AE (3, 5, 10, 15, 20, 25, and 50 mg/mL), negative control (only water), and positive control (ivermectin 0.08% w/v) (Sigma, Aldrich, EUA).²² The egg suspension was incubated for 24 h at 26°C to achieve larvae hatching and obtain *H. contortus* L1. The suspension containing approximately 250 L1 in 1 mL of water was then added to 2 g of feces, followed by 1 mL of diluted AE, and deposited in each of fecal culture flasks. All treatments were performed in four replicates and incubated at 28°C and 60% relative humidity for six days. After this time, infective stage larvae (L3) were obtained according to the methods previously described.²³ The samples were transferred to 24-well plates, Lugol's solution was added to stop the process, and L3 were counted under an inverted microscope. The percent LDT was calculated according to the formula: % LDT = 100 x [(\bar{x} Treated group - \bar{x} Negative control) / \bar{x} Negative control].

3. Larval Migration Test (LMT)

Infective L3 larvae were exsheathed after exposure to sodium hypochlorite (5%) for 25 min and then washed three times in distilled water by centrifugation for 2 min at 1500 rpm to eliminate sodium hypochlorite. After centrifugation, the exsheathed larvae were recovered from the pellet. Approximately 150–160 larvae in 0.25 mL of larval suspension and 0.25 mL of additional distilled water were incubated with 0.5 mL of AE at appropriate concentrations (0.3, 0.5, 0.8, 1, 2, 3, and 4 mg/mL), negative control (only water), and positive control (ivermectin 0.08% w/v) for 16 h in 24-well plates at 28°C. There were four replicates for each extract concentration and the controls. After incubation the larvae were carefully transferred to sieves with 25 µm openings, which were coupled with wells of 24-well plates filled with 1 mL distilled water. The plates were incubated for another 24 h at 28°C. The sieves were then removed, washed in another 24-well plate with 2.5 mL distilled water, and Lugol's solution was added.²⁴ The larvae that did and did not migrate through the mesh were counted and the following formula was applied: % LMT = $(C-T)/(C) \times 100$, where C = % of L3 that migrated in the negative control and T = % of L3 that migrated when treated with different AE concentrations or ivermectin.

F. *In vivo* Test

AE of *P. ostreatus* was tested for efficacy against *H. contortus* in a Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) model of infection.²⁵ Thirty male and female four-week-old outbred gerbils, of body weight of approximately 25–35 g, were obtained from the Animal Care Center of UFSC, Brazil. Animals were kept in polypropylene boxes under proper temperature and humidity ($23 \pm 2^\circ\text{C}$; 40%), provided with commercial rodent chow and water *ad libitum*, and maintained under a light cycle of 12:12 h. All research procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (Number 6262090718).

Experimental animals were immunosuppressed via intramuscular administration of two doses of methylprednisolone (Depo-Medrol®, Pfizer, EUA; 40 mg/mL) every 24 h. Two days later the gerbils were orally challenged with 2000 *H. contortus* L3 larvae. After a week the animals were divided randomly according to their body weight into five groups (n=6); positive control (ivermectin 200 mcg/kg) (Ivomec®, Merial, EUA), negative control (only water), and treatment with different AE concentrations (100, 500, and 1000 mg/kg) given in equal daily doses for five consecutive days. After eight days, gerbils were killed, and larvae were harvested from the stomachs according to the previously described technique.²⁶ The stomachs were opened longitudinally and incubated in 15 mL of distilled water at 37°C for 2 h. Following incubation, the larvae were recovered from the pellet, and the number of *H. contortus* larvae was determined under an inverted microscope.

G. Statistical Analysis

Analysis of concentration-response curves (EC₅₀) of egg hatching, larval development, and L3 migration was calculated from logarithmic non-linear regression function with 95% confidence intervals (GraphPad Prism software, version 5.03). *In vivo* results were summarized as means ± standard error of the mean, larvae counts were transformed into $\log(x + 1)$, and the data were then tested for normality and homogeneity with Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. Then, the means were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test to identify significant differences among treatments ($p < 0.05$).

III. RESULTS

The *P. ostreatus* AE yield (dry weight) was 44% from 100 g of the fresh mushroom. The chromatography analyses indicated that the main constituents are tridecanoic, tetradecanoic, linolelaidic, 9,15-octadecadienoic, and oxalic acids (**Fig. 1**).

In EHT, samples treated with AE at 1.12 mg/mL concentration did not differ ($p > 0.05$) significantly from those treated with thiabendazole. From this concentration onwards, at all evaluated AE concentrations, EHT values were greater than 90% (**Fig. 2A**). Furthermore, based on EHT, the mean lethal AE concentration was 0.73 ± 0.03 mg/mL (**Table 1**).

Concentration-dependent lethal activity was identified in most of the treatments when assessed by LDT assay, reaching the maximum anthelmintic activity at 50 mg/mL AE concentration, which did not differ ($p > 0.05$) significantly from the positive control. Coprocultures treated with ivermectin showed 100% efficacy against worm development (**Fig. 2B**). In contrast, at AE concentrations below 5 mg/mL, there was no effect on larval development. The AE showed an EC_{50} value of 17.24 ± 0.97 mg/mL in the LDT (**Table 1**).

In the absence of treatment, 84.6% of the negative control L3 migrated through the sieve when evaluated by LMT. Ivermectin inhibited all larval migration at 800 μ g/mL. In the AE concentration-response curves, migration inhibition was about 94.73% at 4 mg/mL, but this level of migration inhibition was still statistically equal than the positive control ($p < 0.05$) (**Fig. 2C**). No significant increase in the *in vitro* lethal activity was identified when the AE concentration was increased. Efficacy values obtained in LMT demonstrated the EC_{50} of 1.25 ± 0.19 mg/mL following treatment with AE. The value was significantly higher than that obtained in EHT and lower than that obtained in LDT (**Table 1**).

No differences were observed in larvae counts between gerbil groups that received AE of *P. ostreatus* and negative control (**Fig. 2D**). However, the treatment with ivermectin had a significant effect ($p > 0.05$) on reduction of stomach worms.

IV. DISCUSSION

There has been a growing interest in the use of biocompounds for the development of new anthelmintic drugs not only in human medicine but also for veterinary application,^{27–29} mainly in control of *Haemonchus* parasite, because emerging drug resistance is increasingly observed in nematode populations.³⁰ The use of these biocompounds has been considered a suitable approach for worm control, in view of the variety of flora worldwide,^{31,32} and especially for resource-poor livestock keepers, besides being a clearly sustainable management practice.³³

The main objective of our study was to investigate the effects of *P. ostreatus* AE on *H. contortus* at different developmental stages. In other studies, the effects of *P. djamor* and *P. ostreatus* extracts on *H. contortus* L3 have been evaluated.^{17,34} However, complete information is not available regarding the effectiveness of these extracts against different larval stages and their possible *in vivo* nematicidal effect. In our study *P. ostreatus* extract showed significant effects against *H. contortus* eggs and larvae ($p < 0.05$) (**Fig. 2A, B, and C**), with different EC₅₀ values obtained at each assay (**Table 1**). The organic extract activity was dose-dependent; the *in vitro* nematicidal effect increased proportionally with increasing AE concentration. In recent works, the biologically active compounds from *Agaricus blazei* and *Spigelia anthelmia* were reported to have ovicidal and larvicidal effects in *H. contortus*.^{16,35} The *P. ostreatus* AE showed 100% EHT at 2.24 mg/mL, and the number of unembryonated eggs in AE treatment groups were higher than that of the negative control group ($p \leq 0.05$), indicating that primary inhibition took place in embryogenesis (**Fig. 2**). Research suggests that the nematicide action of biocompounds may adversely affect the quality of the embryo causing interruption of embryonic development, larval formation, and perforation of the egg coat.³⁶ Studies with extract of *P. ostreatus* reported 98.4% reduction in egg hatching of *Meloidogyne incognita*, the major economically important plant-parasitic nematode.³⁷ Other research with the same parasite using crude extracts of *P. tuberregium* and *P. ostreatus* showed that harmful effects of

nematodes were partially suppressed by *P. tuberregium*, while *P. ostreatus* showed complete control of nematode presence in soybean cultivar.³⁸

Our results also demonstrated that the AE of *P. ostreatus* significantly reduced the production and migration of *H. contortus* L3, and the extract had low EC₅₀ (**Table 1**). Studies mention high *P. ostreatus in vitro* capture the activity of *Panagrellus* sp. larvae, complete destruction and/or digestion of the larvae as well as interaction of hyphae with nematodes. The production of toxic droplets by the fungus was also reported.³⁹ In another study, hydroalcoholic extract obtained from *P. djamor* fruiting bodies was reported to cause high mortality of *H. contortus* larvae (98.7%) at 320 mg/mL, 72 h post-exposure. The study showed a wide variety of potentially nematicidal compounds in fractions of *P. djamor*.¹⁷

The evidence suggests that the following fatty acid compounds (**Fig. 1**) possess either ovicidal or larvicidal activity against *H. contortus*.¹⁷ The nematicidal activity (NTA) can be associated with fungal stress response metabolites produced in the fruiting bodies after damage.^{40,41} However, the mechanisms of action of nematicidal fungal substances have not been fully understood. Studies indicate that the mechanism of the activity of *Pleurotus* species is the production of small droplets of toxin derived from linoleic acid that paralyze nematodes and also invasion of nematodes by hyphae.^{42,43} It is also believed that auto-oxidation converts linoleic acid to linoleic acid peroxide,⁴⁴ which then causes the head to shrink and paralyzes the nematodes.⁴³ There are many other unsaturated fatty acids that are present in *P. ostreatus*, and it is possible that they could be converted to peroxides.⁴⁵ Related literature indicates some studies which report the presence of trans-2-decanoic acid in *P. ostreatus*, a compound that also paralyzes *Panagrellus redivivus* nematode.⁴⁶ Other compounds with NTA against the bacteriophagous nematode, *Caenorhabditis elegans*, were isolated from *P. pulmonarius* submerged cultures. Among these compounds were linoleic acid, p-anisyl alcohol, 2-hydroxy-(40-methoxy)-propiophenone, S-coriolic acid, p-anisaldehyde, and 1-(4-methoxyphenyl)-1,2-

propanediol. S-coriolic acid and linoleic acid showed the highest NTA.⁴⁷ Chromatographic profiles indicate the presence of these bioactive compounds in *Pleurotus* mushrooms.^{48,49}

Despite promising *in vitro* results, treatment with *P. ostreatus* AE did not reduce the *H. contortus* burden in infected gerbils (**Fig. 2D**). Several studies have used *M. unguiculatus* as an experimental model of infection with nematodes, such as *Trichostrongylus colubriformis*⁵⁰, *Toxocara canis*⁵¹, *Strongyloides stercoralis*⁵². Gerbils have been described as capable of harboring *H. contortus* in the stomach after immunosuppression.^{25,53,54} However, it is possible that compounds with adulticidal potential cannot be adequately evaluated in gerbils because nematodes progress only until the fourth larval stage. It is also believed that the reduced effects of the AE could be owing to low dose level or insufficient duration of nematode contact. Thus, if the action of compounds requires a more extended period, the model of gerbils may not allow sufficient contact time for the full effects of the studied extract to be evident.⁵⁵

V. CONCLUSION

Pleurotus ostreatus (white variety) AE demonstrated nematicidal effects at low concentrations against the eggs and larvae of *H. contortus in vitro*. However, more studies must be performed to reveal the antiparasitic effect in natural hosts, since our results did not indicate significant anthelmintic activity in the gerbil model.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, for funding this study.

REFERENCES

1. Beux S, Viagi A, Panizzolo R, Cassandro M, Waszczynskyj N. Food supply chain-sustainability in small milk industry. In: IFIP International conference on advances in production management systems. Springer; 2016, pp 598–605.
2. Ivanković A, Štoković I, Barać Z. Adjustment of cattle and sheep production in Croatia to the economic and market environment. In: Cattle husbandry in Eastern Europe and China: Structure, development paths and optimisation. Wageningen Academic Publishers; 2014. p. 213–21.
3. Gasser R, Samson-Himmelstjerna G v. *Haemonchus contortus* and haemonchosis—past, present and future trends. Vol. 93. Academic Press; 2016.
4. Taylor MA, Coop RL, Wall RL. Veterinary Parasitology. 3 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007.
5. Emery DL, Hunt PW, Le Jambre LF. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? Int J Parasitol. 2016;46(12):755–69.
6. Fayaz MR, Abbas RZ, Abbas A, Khan MK, Raza MA, Israr M, Khan JA, Mahmood MS, Saleemi, MK, Rehman TU. Potential of botanical driven essential oils against *Haemonchus contortus* in small ruminants. Boletin latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromaticas. 2019;18(6):533–43.
7. Houdijk JGM, Kyriazakis I, Kidane A, Athanasiadou S. Manipulating small ruminant parasite epidemiology through the combination of nutritional strategies. Vet Parasitol. 2012;186(1–2):38–50.
8. Matos AFIM de, Nobre COR, Monteiro JP, Bevilaqua CML, Smith WD, Teixeira M. Attempt to control *Haemonchus contortus* in dairy goats with Barbervax®, a vaccine derived from the nematode gut membrane glycoproteins. Small Rumin Res. 2017;151:1–4.

9. Mendoza-de Gives P, López-Arellano ME, Aguilar-Marcelino L, Olazarán-Jenkins S, Reyes-Guerrero D, Ramírez-Vargas G, Vega-Murillo VE. The nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* reduces the gastrointestinal parasitic nematode larvae population in faeces of orally treated calves maintained under tropical conditions—Dose/response assessment. *Vet Parasitol.* 2018;263:66–72.
10. Healey K, Lawlor C, Knox MR, Chambers M, Lamb J. Field evaluation of *Duddingtonia flagrans* IAH 1297 for the reduction of worm burden in grazing animals: Tracer studies in sheep. *Vet Parasitol.* 2018;253:48–54.
11. Tamrakar S, Fukami K, Parajuli GP, Shimizu K. Antiallergic activity of the wild mushrooms of Nepal and the pure compound hispidin. *J Med Food.* 2019;22(2):225–7.
12. Tamrakar S, Nishida M, Amen Y, Tran HB, Suhara H, Fukami K, Parajuli GP, Shimizu K. Antibacterial activity of Nepalese wild mushrooms against *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acnes*. *J Wood Sci.* 2017;63(4):379–87.
13. Chang S, Wasser S. Current and future research trends in agricultural and biomedical applications of medicinal mushrooms and mushroom products. *Int J Med Mushrooms.* 2018;20(11):1034–48.
14. Wasser SP. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. *Int J Med Mushrooms.* 2010;12 (1):1–16.
15. Zmitrovich I V, Belova N V, Balandaykin ME, Bondartseva MA, Wasser SP. Cancer without pharmacological illusions and a niche for mycotherapy. *Int J Med Mushrooms.* 2019;21(2):105–19.
16. Vieira TM, Fonseca LD, Bastos GA, de Oliveira Vasconcelos V, Silva MLF, Morais-Costa F, Ferreira AVP, Oliveira NJF, Duarte ER. Control of *Haemonchus contortus* in sheep using basidiocarps of *Agaricus blazei* Murril. *Vet Res Commun.* 2017;41(2):99–106.

17. Pineda-Alegría JA, Sánchez-Vázquez JE, González-Cortazar M, Zamilpa A, López-Arellano ME, Cuevas-Padilla EJ, Mendoza-de-Gives P, Aguilar-Marcelino L. The edible mushroom *Pleurotus djamor* produces metabolites with lethal activity against the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *J Med Food*. 2017;20(12):1184–92.
18. Abdulla MA, Fard AA, Sabaratnam V, Wong K-H, Kuppusamy UR, Abdullah N, Ismail S. Potential activity of aqueous extract of culinary-medicinal Lion's Mane mushroom, *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers.(Aphylllophoromycetideae) in accelerating wound healing in rats. *Int J Med Mushrooms*. 2011;13(1)33–9.
19. Khayyat SA, Roselin LS. Recent progress in photochemical reaction on main components of some essential oils. *J Saudi Chem Soc*. 2018;22(7):855–75.
20. Ueno H, Gonçalves PC. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. Japan International Cooperation Agency, 1988.
21. Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, Taylor MA, Vercruyse J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol*. 2006;136(3):167–85.
22. Camurça-Vasconcelos ALF, Bevilaqua CML, Morais SM, Maciel M V, Costa CTC, Macedo ITF, Oliveira LMB, Braga RR, Silva RA, Vieira LS. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Vet Parasitol*. 2007;148(3–4):288–94.
23. Roberts FHS, O'sullivan PJ. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Crop Pasture Sci*. 1950;1(1):99–102.
24. Rabel B, McGregor R, Douch PGC. Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. *Int J Parasitol*. 1994;24(5):671–6.
25. Gressler LT, Grando TH, do Carmo GM, Vaucher RA, Stefani LM, Monteiro SG.

- Meriones unguiculatus* infected by *Haemonchus contortus*: evaluation of different experimental protocols. J Helminthol. 2019;93(4):447–52.
26. Conder GA, Jen L-W, Marbury KS, Johnson SS, Guimond PM, Thomas EM, Lee BL. A novel anthelmintic model utilizing jirds, *Meriones unguiculatus*, infected with *Haemonchus contortus*. J Parasitol. 1990;70:168–170.
27. Barone CD, Zajac AM, Manzi-Smith LA, Howell AB, Reed JD, Krueger CG, Petersson KH. Anthelmintic efficacy of cranberry vine extracts on ovine *Haemonchus contortus*. Vet Parasitol. 2018;253:122–9.
28. Williams AR, Soelberg J, Jäger AK. Anthelmintic properties of traditional African and Caribbean medicinal plants: identification of extracts with potent activity against *Ascaris suum* *in vitro*. Parasite. 2016;23: 97053.
29. Kuikarni SM, Dighe S. Cultivation of *Hohenbuehelia atrocaerulea* (Fr.) Sing.(Agaricomycetidae): a mushroom with nematicidal potential. Int J Med Mushrooms. 2000;2(2):161-163.
30. Ali Q, Rashid I, Shabbir MZ, Shahzad K, Ashraf K, Sargison ND, Chaudhry U. Population genetics of benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* from buffalo and cattle: implications for the emergence and spread of resistance mutations. Parasitol Res. 2018;117(11):3575–83.
31. André WPP, Ribeiro WLC, Oliveira LMB, Macedo ITF, Rondon FCM, Bevilaqua CML. Essential oils and their bioactive compounds in the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. Acta Sci Vet. 2018;46(1):14.
32. Pathak KML, Chhabra MB. Medicinal plants as alternative to anthelmintics for livestock: An overview with particular reference to Indian subcontinent. Indian J Anim Sci. 2014;84(4):335-49.
33. Hodgkinson JE, Kaplan RM, Kenyon F, Morgan ER, Park AW, Paterson S, Babayan

- SA, Beesley NJ, Britton C, Chaudray U. Refugia and anthelmintic resistance: Concepts and challenges. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2019; 10:51-57.
34. Arizmendi M, Aguilar L, Mendoza de Gives P, Sánchez JE. In vitro activity of *Pleurotus ostreatus* compounds against *Haemonchus contortus* infective larvae (L3). In: 13th International Congress of Parasitology. Ciudad de México, México. 2014.
35. Araujo SA, dos Santos Soares AM, Silva CR, Júnior EBA, Rocha CQ, da Silva Ferreira AT, et al. In vitro anthelmintic effects of *Spigelia anthelmia* protein fractions against *Haemonchus contortus*. *PLoS One.* 2017;12(12):0189803.
36. Krychak-Furtado S, Negrelle RB, Miguel OG, Zaniolo SR, Kapronezai J, Ramos SJ, Sotello A. Efeito de *Carica papaya* L.(Caricaceae) e *Musa paradisiaca* Linn.(Musaceae) sobre o desenvolvimento de ovos de nematódeos gastrintestinais de ovinos. *Arq Inst Biol.* 2005;72(2):191–7.
37. Wille CN, Gomes CB, Minotto E, Nascimento JS. Potential of aqueous extracts of basidiomycetes to control root-knot nematodes on lettuce. *Hortic Bras.* 2019;37(1):54–9.
38. Okorie CC, Ononuju CC, Okwujiako IA. Management of *Meloidogyne incognita* with *Pleurotus ostreatus* and *P. tuberregium* in Soybean. *Int J Agric Biol.* 2011;13(3):401-405.
39. Genier HLA, de Freitas Soares FE, de Queiroz JH, de Souza Gouveia A, Araújo JV, Braga FR, et al. Activity of the fungus *Pleurotus ostreatus* and of its proteases on *Panagrellus* sp. larvae. *African J Biotechnol.* 2015;14(17):1496–503.
40. Stadler M, Sterner O. Production of bioactive secondary metabolites in the fruit bodies of macrofungi as a response to injury. *Phytochemistry.* 1998;49(4):1013–9.
41. Babitskaya VG, Bisko NA, Scherba V V, Mitropolskaya NY, Puchkova TA. Some biologically active substances from medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:

- Fr.) P. Kumm.(Agaricomycetidae). *Int J Med Mushrooms*. 1999;1(4): 345-349.
42. Hibbett DS, Thorn RG. Nematode-trapping in *Pleurotus tuberregium*. *Mycologia*. 1994;86(5):696–9.
43. Satou T, Kaneko K, Li W, Koike K. The toxin produced by *Pleurotus ostreatus* reduces the head size of nematodes. *Biol Pharm Bull*. 2008;31(4):574–6.
44. Cohen N, Cohen J, Asatiani MD, Varshney VK, Yu H-T, Yang Y-C, et al. Chemical composition and nutritional and medicinal value of fruit bodies and submerged cultured mycelia of culinary-medicinal higher Basidiomycetes mushrooms. *Int J Med Mushrooms*. 2014;16(3):273–91.
45. Deveci E, Çayan F, Tel-Çayan G, Duru ME. Structural characterization and determination of biological activities for different polysaccharides extracted from tree mushroom species. *J Food Biochem*. 2019;43:12965.
46. Kwok OCH, Plattner R, Weisleder D, Wicklow DT. A nematocidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. *J Chem Ecol*. 1992;18:127–36.
47. Stadler M, Mayer A, Anke H, Sterner O. Fatty acids and other compounds with nematocidal activity from cultures of Basidiomycetes. *Planta Med*. 1994;60:128–32.
48. Akyüz M, Kireççi ADÖ, Gökçe Z, Kırbağ S, Yılmaz Ö. Biochemical constituents and antioxidant activities of some mushrooms from Turkey: *Agaricus* spp., *Pleurotus* spp., *Morchella esculenta* and *Terfezia boudieri*. *Istanbul J Pharm*. 2019;49:1–6.
49. Golak-Siwulska I, Kałużewicz A, Spizewski T, Siwulski M, Sobieralski K. Bioactive compounds and medicinal properties of oyster mushrooms (*Pleurotus* sp.). *Folia Horti*. 2018;30:191–201.
50. Ziam H, Pandey V., Darwiche J, Losson B, Kumar V. Biological parameters of *Trichostrongylus colubriformis* in *Meriones unguiculatus*. *Vet Parasitol*. 1999;81:309–22.

51. Alba-Hurtado F, Muñoz-Guzmán MA, Valdivia-Anda G, Tórtora JL, Ortega-Pierres MG. *Toxocara canis*: larval migration dynamics, detection of antibody reactivity to larval excretory–secretory antigens and clinical findings during experimental infection of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp Parasitol*. 2009;122:1–5.
52. Charuchaibovorn S, Sanprasert V, Nuchprayoon S. The Experimental infections of the human isolate of *Strongyloides stercoralis* in a rodent model (The mongolian gerbil, *Meriones Unguiculatus*). *Pathogens*. 2019;8:21.
53. Ribeiro WLC, Macedo ITF, dos Santos JML, de Oliveira EF, Camurça-Vasconcelos ALF, Paula HCB, Bevilaqua CML. Activity of chitosan-encapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil on *Haemonchus contortus*. *Exp Parasitol*. 2013;135:24–9.
54. Grando TH, Baldissera MD, Gressler LT, de Sá MF, Bortoluzzi BN, Schafer AS, Ebling RC, Raffin RP, Santos RCV, Stefani LM. *Melaleuca alternifolia* anthelmintic activity in gerbils experimentally infected by *Haemonchus contortus*. *Exp Parasitol*. 2016;170:177–83.
55. Squires JM, Ferreira JFS, Lindsay DS, Zajac AM. Effects of artemisinin and Artemisia extracts on *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Vet Parasitol*. 2011;175:103–8.

Table 1 – EC₅₀ (mg/mL) and 95% confidence intervals (CI) of *Pleurotus ostreatus* AE on *Haemonchus contortus* Egg hatch test (EHT), Larval development test (LDT) and Larval migration test (LMT).

Assay	EC ₅₀ (mg/mL)	95% CI	R square
EHT	0.73	0.70-0.76	0.97
LDT	17.24	16.31-18.23	0.96
LMT	1.25	1.07-1.46	0.86

Figure legends

Fig. 1 - Chromatographic profile obtained by GS from AE of *Pleurotus ostreatus*. The peaks (1-5) indicate the profile of fatty acids.

Fig. 2 - Mean efficacy (\pm SD) of *Pleurotus ostreatus* AE in *Haemonchus contortus* *in vitro* tests: A - Egg Hatching Test (EHT); B - Larval Development Test (LDT); C - Larval Migration Test (LMT), and *in vivo* test: D - Worm load (\pm SD) recovered of *Meriones unguiculatus* experimentally infected with *H. contortus* and treated with *Pleurotus ostreatus* AE.

Fig 1

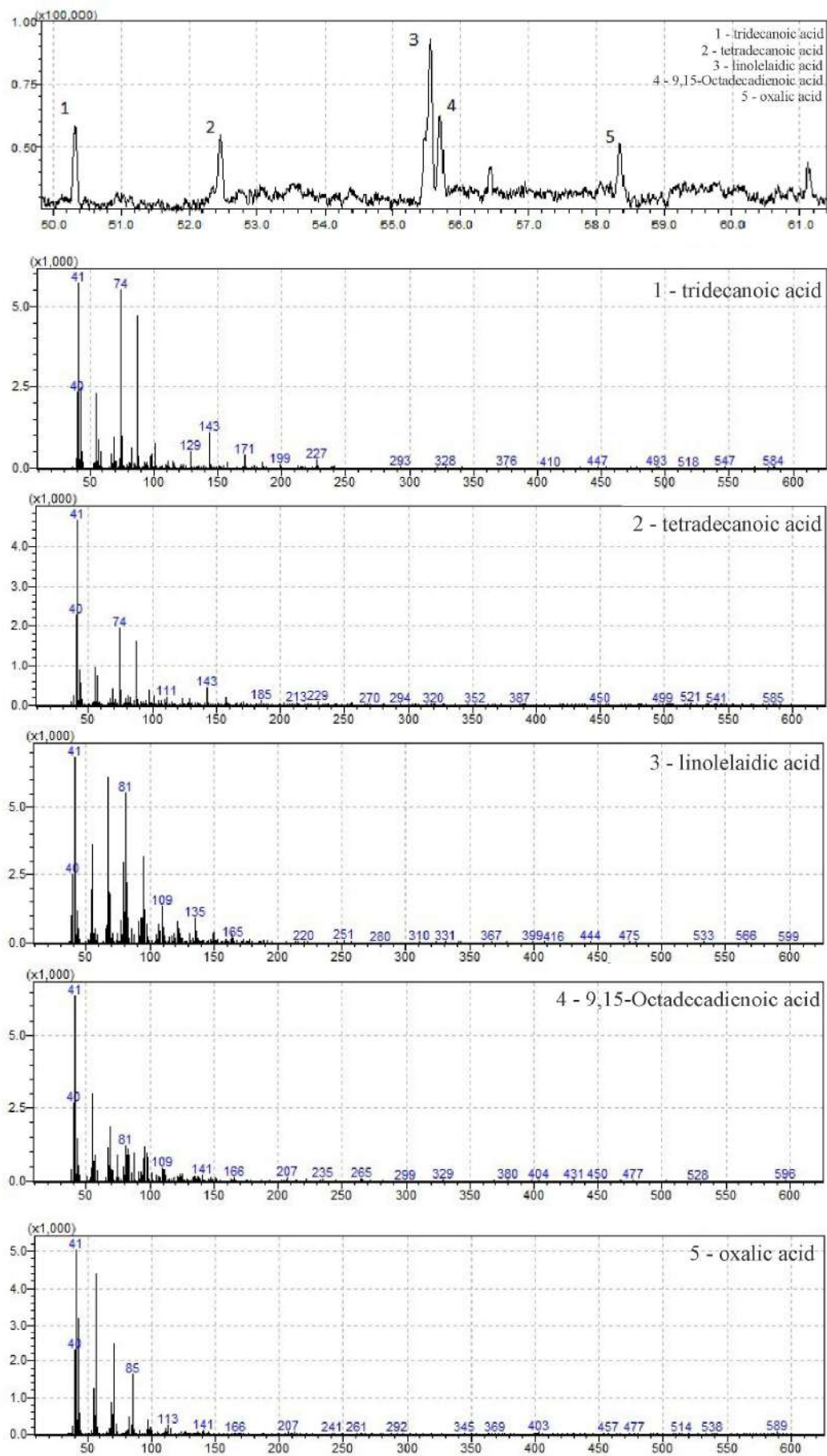
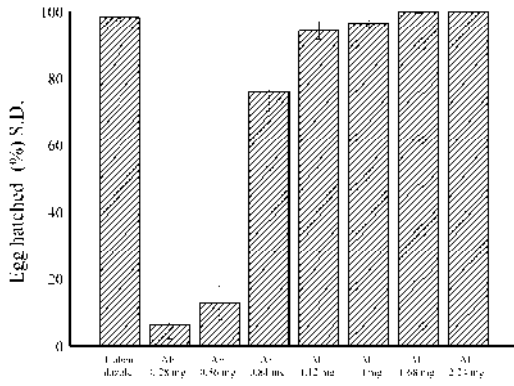
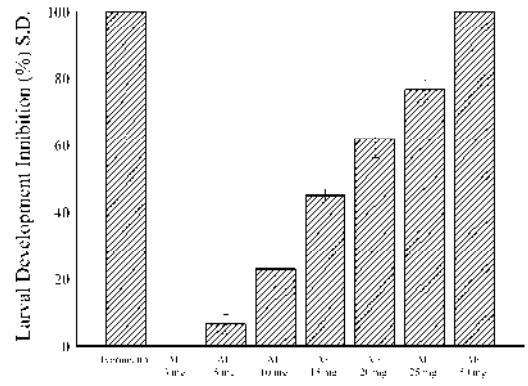


Fig 2

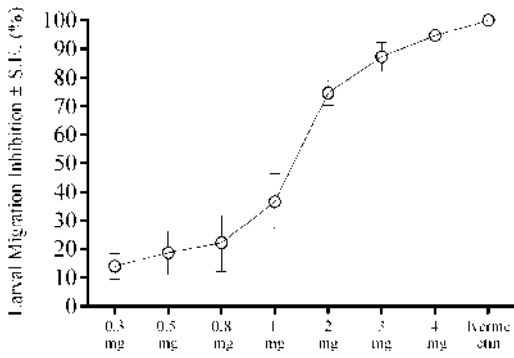
A



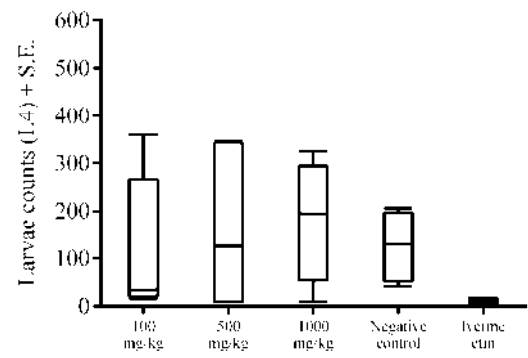
B



C



D



Concentration

4 MANUSCRITO 2

(Artigo submetido para publicação - Journal of Microencapsulation)

Potential of Biodegradable Poly (Lactic-co-Glycolic Acid) Nanospheres as a Delivery System for Anti-*Haemonchus contortus* IgY Antibodies

Antônio Francisco Igor Magalhães de Matos^{1*}, Lucas Trevisan Greesler², Mateus Fracasso¹, Samantha Nunes de Godoi³, Letícia dos Santos Petry¹, Aline Ferreira Ourique³ and Silvia Gonzalez Monteiro^{3*}

¹ Universidade Federal de Santa Maria, Microbiology and Parasitology Department, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Universidade de Cruz Alta, Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil.

³ Universidade Franciscana, Graduate Program in Nanosciences, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

*Corresponding authors:

Universidade Federal de Santa Maria

Av. Roraima, nº 1000, Camobi

CEP: 97105-900

Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

Phone: + 55 55 32205889

E-mail: igormagalhaes@veterinario.med.br; sgmonteiro@uol.com.br

Abstract

In this study, poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanospheres with different lactic:glycolic acid ratios were tested for their use as carriers for the controlled delivery of anti-*Haemonchus contortus* IgY antibodies. Nanospheres of 50:50 and 82:18 lactic:glycolic acid ratios were fabricated using the double-emulsion solvent extraction method, and their particle characteristics were evaluated by photon correlation spectroscopy and scanning electron microscopy. Additionally, their release of the loaded IgY antibodies was investigated both *in vitro* and *in vivo*. The 50:50 and 82:18 PLGA nanospheres had a mean (\pm standard error) size of 283.8 ± 1.24 and 347.0 ± 6.69 nm and a mean encapsulation efficiency of $41.3 \pm 5.9\%$ and $56.7 \pm 1.9\%$, respectively. Both groups of nanospheres were able to release the antibodies continuously under *in vitro* conditions, especially those of the 82:18 group, which released the antibodies for 126 days. However, the *in vitro* release profiles were not reproducible *in vivo*, where the 82:18 nanospheres released the antibodies for 3 days only despite the significant difference between the release profiles of the two PLGA groups. Nonetheless, our findings indicate that PLGA nanospheres are promising candidates for the controlled delivery of an antibody against *H. contortus*. More research is needed to increase the encapsulation efficiency of these nanospheres and to evaluate the responses of the different formulations in a target host.

Keywords: IgY; *Haemonchus*; PLGA Nanospheres; Controlled Release; *In Vivo* Assay

Introduction

The productivity of small ruminants is severely affected by gastrointestinal nematode infections.¹ Among the helminths, the highly pathogenic *Haemonchus contortus* is the most prevalent of the blood-sucking gastrointestinal nematodes, causing haemonchosis in goats and sheep. The prolific adult female worms can produce up to 10,000 eggs per day. These eggs are excreted in the host feces and develop on pasture to third-stage larvae (L3), which then go on

to infect new hosts when ingested.² The clinical signs associated with infections by these hematophagous adult worms are anemia, gastritis, diarrhea, and bottle jaw (accumulation of fluid under the lower jaw), with death occurring in severely affected animals.³

Although several classes of anthelmintic drugs (imidazothiazoles, benzimidazoles, and macrocyclic lactones) and a recently launched aminoacetonitrile derivative are available to control haemonchosis. The use of such chemical drugs is compromised by the widespread emergence of resistant nematode populations.⁴ Besides that, the growing concern over the possible environmental impacts of anthelmintic residues and the consumer demand for chemical-free animal products have increased the need for alternative worm control strategies, such as improved nutritional and grazing management, genetic selection, biological control, alternative anthelmintic compounds, and vaccines.^{5,6}

One of the most promising new approaches to nematode management is immunotherapy. A recent study has indicated that chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY), the predominant antibody in chicken, can be used to control *H. contortus*.⁷ The molecular weight of the IgY antibodies produced in birds and reptiles resemble that of mammalian IgG. IgY is transferred exclusively from the serum to the egg yolk by passive immunity in hens,⁸ and several immunogenic antigens (e.g., bacteria, virus, proteins, and recombinant proteins) have been used as stimulants for its production.⁹⁻¹¹ The antibody can also be obtained in large yields through a simple and economical isolation process, with over 100 mg of purified IgY being obtained from a single egg.^{12,13}

Despite such promising results, proper strategies are still needed to prolong the lifetime of the immunoglobulin in the host in order for it to act on the target parasite.^{14,15} The use of nanoparticles for the controlled release of immunoglobulins is a promising strategy that could offer a solution to this problem. It was previously demonstrated that poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles enabled the delivery of model antibodies.¹⁶ PLGA, a biocompatible

and biodegradable copolymer belonging to the polylactide family of polyesters that have been used as excipients for various drug delivery formulations (nanospheres and implants), has a good safety record¹⁷ and can be an attractive means for the controlled release of IgY antibodies. Although there are published reports on the controlled release of IgY, to our best knowledge, there are no studies that have investigated the potential of PLGA nanospheres for the delivery of IgY via subcutaneous injection. In view of the knowledge gaps on PLGA polymers, the aims of the current study were to investigate the physical characteristics of different PLGA nanosphere formulations as well as their capacities to retain and distribute anti-*H. contortus* IgY antibodies both *in vitro* and after their subcutaneous injection into rats.

Materials and methods

Preparation of immunoglobulin Y antibodies

The chicken polyclonal antibodies, which were kindly donated by LT Gressler (Universidade Federal de Santa Maria, Brazil), were purified from hens' eggs according to the method described in a previous study.⁷ In brief, hens were first injected intramuscularly with *H. contortus* proteins and then inoculated with booster injections at 2-week intervals. After the first booster injection, the eggs were collected and stored at 4°C in a refrigerator until use. To obtain the antibodies, the yolks were isolated and the IgY antibodies were purified using the organic solvent extraction method.¹⁸ The activity of the IgY antibodies was measured with the dot-blot assay to yield batches with equal activity.

Preparation of the nanospheres

The PLGA nanospheres loaded with anti-*H. contortus* IgY antibodies were prepared from two groups of copolymers with different lactic:glycolic acid ratios (50:50 and 82:18) (Purasorb[®], Corbion, The Netherlands), using the double-emulsion solvent extraction (water-

in-oil-in-water (w/o/w)) method with poly(vinyl alcohol) (PVA) as a stabilizer.¹⁹ In brief, 200 mg of PLGA nanospheres was dissolved in 2 mL of dichloromethane and then emulsified with 250 μ L of 10% IgY in phosphate-buffered saline (PBS). The emulsion (w/o) was transferred to 10 mL of an aqueous 3% PVA (#363065, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) solution and sonicated with a probe-type sonicator for 60 s at 60 W (Fisherbrand™ Q500 Sonicator, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The resulting emulsion was stirred magnetically (Magnetic Stirrer NT103, Novatecnica, Piracicaba, Brazil) for approximately 4 h at 28°C to allow solvent evaporation. Finally, the nanospheres were collected by centrifugation (4000 rpm for 30 min), resuspended and washed three times in ultrapure water, and finally freeze dried (Liobras, model L101 Liotop, São Carlos, SP, Brasil).

Characterization of the nanospheres

The average particle size and zeta potential of the nanospheres were measured using a Zetatrac device (Microtrac, Montgomeryville, PA, USA). The measurements were obtained by photon correlation spectroscopy using a 10-mW laser light source at 25°C, and the data were collected with a 90° dispersion angle. A 200- μ L sample of the nanosphere suspension in ultrapure water at the standard concentration and loading index was added to the measurement chamber of the instrument. The morphology of the nanospheres was examined by scanning electron microscopy (SEM) (Vega3, Tescan Analytics, Fuveau, France). The lyophilized nanospheres were mounted on aluminum stubs, whereupon images were generated at a temperature of 2°C, tension of 10 kV, and pressure of 3.7–5.1 Torr.²⁰

Encapsulation efficiency of the nanospheres

The IgY encapsulation efficiency of the PLGA nanospheres was determined using a bicinchoninic acid protein assay kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Approximately 20 mg of nanospheres was dissolved in 500 μ L of 0.1 M NaOH containing 5%

sodium dodecyl sulfate (BDH Chemicals, Poole, UK) and the mixture was incubated at 37°C for 2 h. Then, the solution was centrifuged (5 min at 4000 rpm) to separate the IgY antibodies from the nanospheres. Thereafter, the protein content in 75 µL of the supernatant was analyzed (in triplicate) using the standard curve of known concentrations of bovine serum albumin (25–2000 µg/mL) in the same dilution solution. The microtiter plates were incubated under gentle shaking for 30 min at 37° (21), following which the absorbance of the solution in the wells was measured at 562 nm using a microplate reader (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific). The loading efficiency (LE) was calculated using the following formula: $LE = [(W1) \text{ free protein recovered from the nanospheres} / (W2) \text{ initial amount protein}] \times 100$.¹⁹

In vitro release assay

A particle stability assay was performed to evaluate the timing of IgY release from the two different PLGA formulations. In brief, 50 mg of the IgY-loaded nanospheres was suspended in 2 mL of Tris-buffered saline (TBS; pH 7.4) containing 0.01% Triton-X and incubated at 37°C under continuous stirring (150 rpm) for 210 days. At every 7 days, the supernatant was discarded after centrifugation of the nanospheres (12,000 ×g for 10 min) and the pellet was resuspended in Tris-buffered saline (TBS; pH 7.4) containing 0.01% Triton-X and transferred back to the original containers (2 mL Eppendorf® Safe-Lock microcentrifuge tubes).²⁰ The released IgY antibodies were quantified using the bicinchoninic acid protein assay kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. To eliminate background interference, a blank sample was also prepared, which consisted of only nanospheres resuspended in TBS. All analyses were conducted in triplicate.

In vivo procedures

The retention and biodistribution of the IgY antibodies formulated into 50:50 and 82:18 PLGA nanospheres were evaluated *in vivo* through their subcutaneous injection into rats. Twenty-four Wistar rats (male and female), purchased from the Central Vivarium of the Federal University of Santa Maria (UFSM, Brazil), were housed under specific pathogen-free conditions at the animal facility at the Parasitology Laboratory of UFSM. The experiment was performed in accordance with the guidelines of the Institutional Ethical Committee for Animal Experimentation of UFSM (n° 8079170420). Each of the following four experimental groups involved six rats: group 1, IgY–PLGA 50:50; group 2, IgY–PLGA 82:18; group 3, free IgY; group 4, control (TBS with 0.01% Triton-X). In groups 1, 2 and 3, each rodent received 2 mg of IgY formulated with the respective PLGA nanospheres. Blood samples were collected during the first 72 hrs and thereafter every two weeks until 70 days, where each 250- μ L sample was placed into a 0.5-mL Eppendorf tube and centrifuged at 4000 rpm for 10 min at 4°C. The sera were then stored at –20°C until analysis.²¹

Antibody detection

The total antibody amount released from the PLGA nanospheres *in vivo* was analyzed using the enzyme-linked immunosorbent assay²², with some modifications. In brief, 96-well polystyrene plates (Thermo Fisher Scientific) were coated with 100 μ L of goat anti-chicken IgG polyclonal antibodies (1:1000; Thermo Fisher Scientific) in coating buffer (0.05 M NaHCO₃, pH 9.6) and incubated for 14 h at 4°C. The plates were then washed three times with PBS (pH 7.2) containing 0.05% Tween-20 and 0.01% gelatin (PBS-GT) (Sigma-Aldrich), and nonspecific binding was blocked with the same buffer solution at 4°C overnight. After three washing with PBS-GT, the serum samples (1:100) were added to the wells (in triplicate), and the plates were incubated for 1 h at 25°C. Following three washes with PBS-GT, horseradish

peroxidase-labeled goat anti-IgY IgG (diluted 1:10,000 in PBS-GT, H + L chain specific, Thermo Fisher Scientific Ltd., Altrincham, UK) was added to the wells and incubation was carried out for 1 h at 25°C. Thereafter, the reaction was developed by the addition of 0.1 M *o*-phenylenediamine dihydrochloride (pH 5.6; Sigma-Aldrich) containing 0.06% H₂O₂. The reaction was terminated by the addition of 50 µL of 2.8% (v/v) sulfuric acid, following which the absorbance at 492 nm was measured (Multiskan FC).

Statistical analysis

All data were tested for normality and homogeneity with the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. Significant differences between groups were calculated by analysis of variance ($p < 0.05$) using SAS (version 9.2). The variables were analyzed with the F-test and one-way analysis of variance, followed by Tukey's test.

Results

The SEM images of the particles examined in this study are shown in Figure 1. The PLGA molecules encapsulating IgY antibodies against *H. contortus* were spherical in shape and uniformly distributed. For the 50:50 and 82:18 PLGA nanospheres, the respective average diameters were 283.8 and 347 nm ($p < 0.05$), the zeta potentials were -3.67 ± 0.159 and -4.51 ± 0.09 mV (Table 1) with negative polarity, and the IgY encapsulation/loading efficiencies were $41.3 \pm 5.9\%$ and $56.7 \pm 1.9\%$.

In the *in vitro* tests, the 50:50 PLGA nanospheres exhibited extensive erosion and breakdown at 21 days, with a degradation half-life (50% loss of molecular weight) of ± 5 days. After this initial burst, there was a slow-release phase, with 100% of total release occurring at 49 days (Figure 2). By contrast, the 82:18 PLGA nanospheres exhibited a slower erosion rate

(Figure 2), with a degradation half-life of ± 35 days and total release of the antibodies at 126 days.

The mean absorbance (\pm standard error of the mean) values of the serum antibodies verified the statistically significant difference in IgY release between the 82:18 and 50:50 PLGA nanospheres (Figure 3). However, the IgY release period was extended for a maximum of 72 h under the *in vivo* conditions.

Discussion

This study investigated the possible use of 50:50 and 82:18 PLGA nanospheres for encapsulating anti-*H. contortus* IgY and whether they could induce a better release of these antibodies. Although subunit vaccines, another alternative method of immunological control, hold promise in their effectiveness against various pathogens (including *H. contortus*), their success is hampered by their weak and short-term immunity, which necessitates several rounds of co-administration.²³ Immunotherapy can be an alternative for controlling this parasite because the antibodies are formed at the last stage of an immune response.²⁴ With recent advances in the development of different molecule-delivery vehicles, the available particulate carriers like nanospheres hold great promise for the delivery and release of effective antibodies against parasites such as *H. contortus*.

The IgY-loaded PLGA nanospheres prepared by the double-emulsion solvent extraction method in our study were basically spherical in shape and with a comparatively smooth surface, as indicated by morphological SEM examination. Usually, the differences among spherical, flattened ball-like, and porous-like nanospheres may be related to the species of polymers used and the drying process.²⁰ It has been demonstrated that increases in the particle hydrophobicity, PLGA molecular weight, and lactic:glycolic acid ratio will result in a decrease in the surface porosity of the nanoparticles.²⁵ In another study²⁶, 50:50 PLGA microspheres were shown to

be spherical and with a smooth surface, whereas 75:25 PLGA microspheres were spherical and with a rough surface, which differed from our two groups of nanospheres (50:50 and 82:18) having the same surface morphology.

Many studies have used the designation “nanoparticles” to refer to particles of up to 1000 nm (1 μm) in size and “microparticles” for those that range from 1 to 1000 μm .^{27–29} Based on these parameters, our particles fell into the nanoscalar size range. Previous studies that had obtained the same nanosphere morphology as ours had used a similar protocol in terms of the sonication time range and power level, two important factors that determine the size of the molecules.^{30,31} It is worth mentioning that for all practical purposes, it is particularly relevant to use small particles for targeted delivery systems because they are more effective and efficient than large-sized particles³² in permeating biological barriers, passing through capillaries after injection, and achieving stability in blood circulation.^{33,34}

The zeta potential is one of several factors that can affect the release of particulate proteins.³⁵ In our study, the 50:50 and 82:18 PLGA nanospheres showed low negative zeta potentials (-3.67 and -4.51 mV, respectively). One of the biggest problems with PLGA is the aggregation of the nanospheres, regardless of the preparation method.³⁶ To overcome this, stabilizers are commonly used, in particular PVA, which was used in our study.³⁷ The PVA molecules localize on the surface of the PLGA particles and prevent their aggregation by changing the surface characteristics, such as the zeta potential.³⁶ Some studies that had followed the same protocol as the one we employed still showed different results to ours, even with a stabilizer introduced. One study that used a 2.5% PVA emulsion stabilizer produced BPI3V-encapsulated PLGA nanoparticles that were on average 225.4 nm in diameter and held a zeta potential of -22.7 mV with high negative polarity.³⁸ Another study that used 0.5% PVA obtained rutin/benzamide-loaded PLGA nanospheres of 155 nm in size with a zeta potential of -18 ± 0.4 mV.³⁹ However, a recent study that used 3% PVA produced nanospheres with

positive zeta potential values.⁴⁰ Regardless of the differing results obtained by these studies, the zeta potential is an important parameter that indicates the stability of the nanospheres and their adequate dispersion in an aqueous medium without aggregation, where a surface charge value of ± 30 mV indicates high stability due to electrical repulsion.⁴¹

In the search for a successful nanoparticle formulation, an important criterion is to obtain a high loading capacity in order to reduce the amount of carrier required for each administration dose. In our study, the encapsulation efficiency of the 82:18 PLGA nanospheres was higher than that of their 50:50 counterparts. In the double-emulsion solvent evaporation method with PLGA, the stability of the first emulsion plays a key role in achieving encapsulation efficiency, in addition to the choice of solvents and the stirring rate^{42,43}. In one study that evaluated the effect of protein (bovine serum albumin) loading on the properties of the particles, an increase of the stirring rate reportedly led to a lower encapsulation efficiency.⁴⁴ Other researchers reported an encapsulation/loading efficiency of 52.6% for BPI3V-encapsulated nanoparticles in calves.³⁸ Another study that used PLGA nanoparticles for the encapsulation of ovalbumin obtained an encapsulation efficiency in the range of 30–60% for most samples.³⁵ Therefore, our results were in accordance with the findings of these other studies. However, a common strategy for increasing the encapsulation efficiency is to increase the polymer concentration, which seems to increase the viscosity and therefore delays the diffusion of the molecules.^{45,46} This was made clear in a study on the effects of polymer concentrations on the particle characteristics, beyond an increase in sphere size.⁴⁴

With regard to the degradation rate of our fabricated delivery systems, the *in vitro* release profiles showed clear differences between the two IgY–PLGA formulations (Figure 2), with the 82:18 PLGA formulation showing a prolonged and steady release of the loaded antibodies that continued over the 126 days of assay. The 50:50 PLGA formulation exhibited a double-release profile, with an initial period of fast release and a second period in which the spheres

released the antibodies in a sustained way, as previously found by other authors using the same polymer.⁴⁷ The lactic:glycolic acid ratio of 50:50 results in greater instability against hydrolysis and less resistance to degradation than that shown by PLGA nanospheres with a higher lactic acid composition. In other words, the higher the proportion of lactic acid units in the polymer, the greater its hydrophobic character and, consequently, the lower the hydrolysis index.⁴⁸ Studies have demonstrated that the particle size and surface morphology influence the release profile of protein-loaded PLGA nanospheres^{49,50}, where bigger particles have less initial release than smaller particles.⁴⁹ Another study demonstrated that the *in vitro* polymer degradation rates did not vary substantially for different particle sizes.⁵¹ However, other researchers have attributed the difference in release rates to the differences in surface roughness, morphology, and porosity of the PLGA particles.⁵²

Although our *in vitro* results showed that the 82:18 PLGA nanospheres allowed for a long controlled release of the anti-*Haemonchus* IgY molecules, in agreement with the results obtained by other researchers⁵³, these results were not completely extended to the *in vivo* conditions where antibody release only reached 3 days. After this time, the 82:18 polymer had likely achieved a lower degradation rate for a few days, as indicated by the release pattern. Despite records in the literature pointing to a positive correlation between *in vitro* and *in vivo* release ratios⁵⁴, studies have shown that different experimental protocols lead to distinct results in terms of molecule availability *in vivo*.⁵⁵ Given that our study has provided very relevant results, further experiments with different application routes are warranted to substantiate the findings.

Conclusion

In summary, we demonstrated that PLGA nanospheres have the ability to serve as IgY antibody depots, and that nanoparticles may be exploited for targeted antibody delivery *in vivo*.

The 82:18 PLGA nanospheres were capable of releasing antibodies efficiently and for a long duration. More studies need to be done on increasing the encapsulation efficiency of the IgY-loaded PLGA nanospheres and evaluating the response of the formulations in a target host.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This project has received funding from National Council for Scientific and Technological Development – CNPq and the postgraduate program 2017-2021 of Programa de Excelência Acadêmica (PROEX). The first author also would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) by PhD scholarship and Dr. Roberto Nicolete of Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) for technical support.

ORCID iD

Antônio Francisco Igor Magalhães de Matos - <https://orcid.org/0000-0002-1705-3462>

References

1. O'Connor LJ, Walkden-Brown SW, Kahn LP. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Vet Parasitol* 2006; 142: 1–15.
2. Taylor MA, Coop RL, Wall RL (2007) *Veterinary Parasitology* 3 Ed, Chapter 3: Parasites of Sheep and Goats. Blackwell Publishing.
3. Hoste H, Torres-Acosta JFJ, Quijada J, et al. Interactions between nutrition and infections with *Haemonchus contortus* and related gastrointestinal nematodes in small

- ruminants. *Advances in parasitology* 2016; 93: 239–351.
4. McKellar QA, Jackson F. Veterinary anthelmintics: Old and new. *Trends Parasitol* 2004; 20: 456–461.
 5. Gasser R, Samson-Himmelstjerna GV (2016). *Haemonchus contortus and haemonchosis—past, present and future trends*. In press London.
 6. Matos AFIM de, Nobre COR, Monteiro JP, et al. Attempt to control *Haemonchus contortus* in dairy goats with Barbervax®, a vaccine derived from the nematode gut membrane glycoproteins. *Small Rumin Res* 2017; 151: 1–4.
 7. Gressler LT. Produção de imunoglobulina Y anti-*Haemonchus contortus* e Aplicação imunoterápica em *Meriones unguiculatus*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, 2018.
 8. Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern Lab Anim* 2005; 33: 129–154.
 9. da Silva Raposo R, Santarém VA, Meriguetti YFFB, et al. Kinetic and avidity of IgY anti-*Toxocara* antibodies in experimentally infected chickens. *Exp Parasitol* 2016; 171: 33–41.
 10. Wen J, Zhao S, He D, et al. Preparation and characterization of egg yolk immunoglobulin Y specific to influenza B virus. *Antiviral Res* 2012; 93: 154–159.
 11. Zhang Y, Tan W, Zhang L, et al. Highly sensitive and selective colorimetric determination of *Staphylococcus aureus* via chicken anti-protein A IgY antibody. *Anal Methods* 2019; 11: 3665–3670.
 12. Hatta H, Tsuda K, Akachi S, et al. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosci Biotechnol Biochem* 1993; 57: 450–454.

13. Yi L, Qin Z, Lin H, et al. Features of chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) against the infection of red-spotted grouper nervous necrosis virus. *Fish Shellfish Immunol* 2018; 80: 534–539.
14. Wang C, Yu C, Liu J, et al. Stabilization of human immunoglobulin G encapsulated within biodegradable Poly (Cyclohexane-1, 4-diyl acetone dimethylene ketal)(PCADK)/Poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) Blend Microspheres. *Protein Pept Lett* 2015; 22: 963–971.
15. Wang J, Chua KM, Wang C-H. Stabilization and encapsulation of human immunoglobulin G into biodegradable microspheres. *J Colloid Interface Sci* 2004; 271: 92–101.
16. Torché A-M, Le Dimna M, Le Corre P, et al. Immune responses after local administration of IgY loaded-PLGA microspheres in gut-associated lymphoid tissue in pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 109: 209–217.
17. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control release* 2012; 161: 505–522.
18. Pauly D, Chacana PA, Calzado EG, et al. IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. *J Vis Exp JoVE*.
19. Ma T, Wang L, Yang T, et al. Homogeneous PLGA-lipid nanoparticle as a promising oral vaccine delivery system for ovalbumin. *asian J Pharm Sci* 2014; 9: 129–136.
20. Feng L, Qi XR, Zhou XJ, et al. Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-dose hepatitis B vaccine using PLGA microspheres. *J Control Release* 2006; 112: 35–42.
21. Wesche P. Rodents: clinical pathology. In: *BSAVA manual of rodents and ferrets*. BSAVA Library, 2009, pp. 42–51.
22. Suh LYK, Kartoon T, Gujral N, et al. The use of chicken igy in a double antibody

- sandwich Elisa for the quantification of melittin in bee venom and bee venom melittin content in cosmetics. *J Apic Sci* 2015; 59: 97–107.
23. Meier L, Torgerson PR, Hertzberg H. Vaccination of goats against *Haemonchus contortus* with the gut membrane proteins H11/H-gal-GP. *Vet Parasitol* 2016; 229: 15–21.
 24. Abbas AT, El-Kafrawy SA, Sohrab SS, et al. IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections. *Hum Vaccin Immunother* 2019; 15: 264–275.
 25. Silva AL, Rosalia RA, Sazak A, et al. Optimization of encapsulation of a synthetic long peptide in PLGA nanoparticles: Low-burst release is crucial for efficient CD8⁺ T cell activation. *Eur J Pharm Biopharm* 2013; 83: 338–345.
 26. Saini V, Jain V, Sudheesh MS, et al. Comparison of humoral and cell-mediated immune responses to cationic PLGA microspheres containing recombinant hepatitis B antigen. *Int J Pharm* 2011; 408: 50–57.
 27. Gutierro I, Hernandez RM, Igartua M, et al. Size dependent immune response after subcutaneous, oral and intranasal administration of BSA loaded nanospheres. *Vaccine* 2002; 21: 67–77.
 28. Kreuter J. Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery. *J Anat* 1996; 189: 503.
 29. Sharp FA, Ruane D, Claass B, et al. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106: 870–875.
 30. Mutalik S, Suthar NA, Managuli RS, et al. Development and performance evaluation of novel nanoparticles of a grafted copolymer loaded with curcumin. *Int J Biol Macromol* 2016; 86: 709–720.

31. Kang F, Jiang G, Hinderliter A, et al. Lysozyme stability in primary emulsion for PLGA microsphere preparation: effect of recovery methods and stabilizing excipients. *Pharm Res* 2002; 19: 629–633.
32. Mumper RJ, Cui Z, Oyewumi MO. Nanotemplate engineering of cell specific nanoparticles. *J Dispers Sci Technol* 2003; 24: 569–588.
33. Huang L, Wang Y, Ling X, et al. Efficient delivery of paclitaxel into ASGPR over-expressed cancer cells using reversibly stabilized multifunctional pullulan nanoparticles. *Carbohydr Polym* 2017; 159: 178–187.
34. Monfardini C, Veronese FM. Stabilization of substances in circulation. *Bioconjug Chem* 1998; 9: 418–450.
35. Akagi T, Baba M, Akashi M. Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine. In: *Polymers in nanomedicine*. Springer, 2011, pp. 31–64.
36. Mohammadi-Samani S, Taghipour B. PLGA micro and nanoparticles in delivery of peptides and proteins; problems and approaches. *Pharm Dev Technol* 2015; 20: 385–393.
37. Jahanzad F, Sajjadi S. Two-stage stabilizer addition protocol as a means to reduce the size and improve the uniformity of polymer beads in suspension polymerization. *J Appl Polym Sci* 2018; 135: 45671.
38. Mansoor F, Earley B, Cassidy JP, et al. Comparing the immune response to a novel intranasal nanoparticle PLGA vaccine and a commercial BPI3V vaccine in dairy calves. *BMC Vet Res* 2015; 11: 220.
39. Deepika MS, Thangam R, Sheena TS, et al. Dual drug loaded PLGA nanospheres for synergistic efficacy in breast cancer therapy. *Mater Sci Eng C* 2019; 103: 109716.
40. Salama AH, Abdelkhalek AA, Elkasabgy NA. Etoricoxib-loaded bio-adhesive

- hybridized polylactic acid-based nanoparticles as an intra-articular injection for the treatment of osteoarthritis. *Int J Pharm* 2020; 578: 119081.
41. Müller RH, Jacobs C, Kayser O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: rationale for development and what we can expect for the future. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 47: 3–19.
 42. Chaisri W, Hennink WE, Okonogi S. Preparation and characterization of cephalexin loaded PLGA microspheres. *Curr Drug Deliv* 2009; 6: 69–75.
 43. Mao S, Xu J, Cai C, et al. Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres. *Int J Pharm* 2007; 334: 137–148.
 44. Yang Y-Y, Chung T-S, Ng NP. Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials* 2001; 22: 231–241.
 45. Yeo Y, Park K. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Arch Pharm Res* 2004; 27: 1.
 46. Manchanda R, Fernandez-Fernandez A, Nagesetti A, et al. Preparation and characterization of a polymeric (PLGA) nanoparticulate drug delivery system with simultaneous incorporation of chemotherapeutic and thermo-optical agents. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2010; 75: 260–267.
 47. Rosas JE, Hernandez RM, Gascon AR, et al. Biodegradable PLGA microspheres as a delivery system for malaria synthetic peptide SPf66. *Vaccine* 2001; 19: 4445–4451.
 48. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci* 2007; 32: 762–798.
 49. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids surfaces B biointerfaces* 2010; 75: 1–18.

50. Makadia HK, Siegel SJ. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel)* 2011; 3: 1377–1397.
51. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 329–347.
52. Yang Q, Owusu-Ababio G. Biodegradable progesterone microsphere delivery system for osteoporosis therapy. *Drug Dev Ind Pharm* 2000; 26: 61–70.
53. Silva ATCR, Cardoso BCO, e Silva MESR, et al. Synthesis, characterization, and study of PLGA copolymer *in vitro* degradation. *J Biomater Nanobiotechnol* 2015; 6: 8.
54. Carcaboso AM, Hernandez RM, Igartua M, et al. Potent, long lasting systemic antibody levels and mixed Th1/Th2 immune response after nasal immunization with malaria antigen loaded PLGA microparticles. *Vaccine* 2004; 22: 1423–1432.
55. Fredriksen BN, Grip J. PLGA/PLA micro-and nanoparticle formulations serve as antigen depots and induce elevated humoral responses after immunization of *Atlantic salmon* (*Salmo salar* L.). *Vaccine* 2012; 30: 656–667.

Legends to Figures

Fig. 1 - Scanning electron photograph of the nanospheres. A - no-loaded PLGA 50:50 nanospheres; B - loaded PLGA 50:50 nanospheres with IgY/anti-*Haemonchus* ; C - No-loaded PLGA 82:18 nanospheres ; D - loaded PLGA 82:18 nanospheres with IgY/anti-*Haemonchus*.

Fig. 2 - *In vitro* release profile of IgY/anti-*Haemonchus* from PLGA 50:50 and 82:18 nanospheres.

Fig. 3 - Serum IgY antibodies after subcutaneous application with 2 mg of IgY/anti-*Haemonchus* free and nanoencapsulated with PLGA 50:50 and 82:18.

Table 1 – Nanospheres characterization

<i>Copolymer</i>	<i>Size (nm)</i>	<i>Polydispersity index (PDI)</i>	<i>Zeta potential (mV)</i>	<i>Encapsulation efficiency (%)</i>
IgY-PLGA 50:50	283.8 ± 1.24a	0.125 ± 0.015	- 3.67 ± 0.159	41.3 ± 5.9
IgY-PLGA 82:18	347.0 ± 6.69b	0.166 ± 0.003	- 4.51 ± 0.09	56.7 ± 1.9
Mean ± standard deviation				

Fig. 1

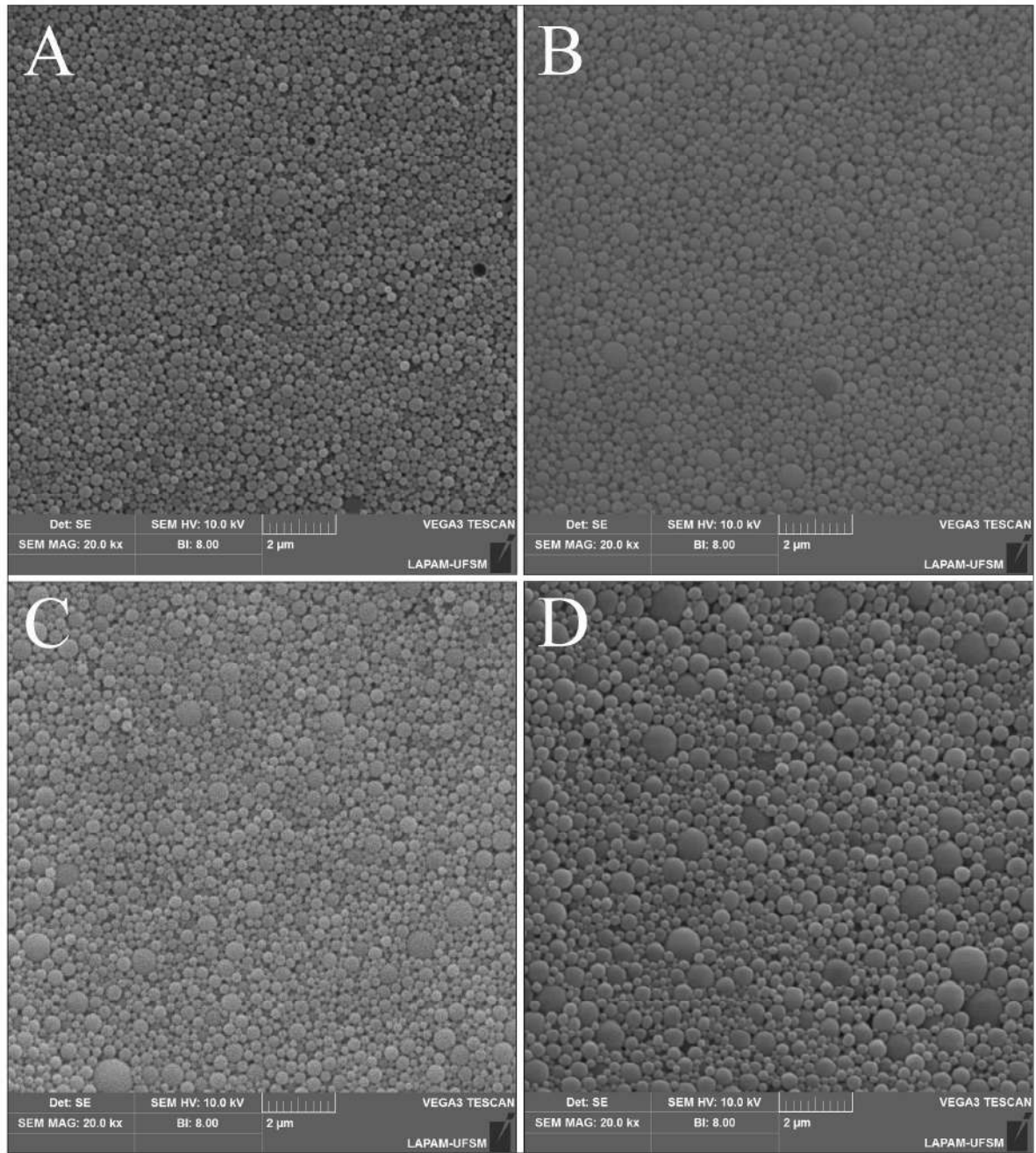


Fig. 2

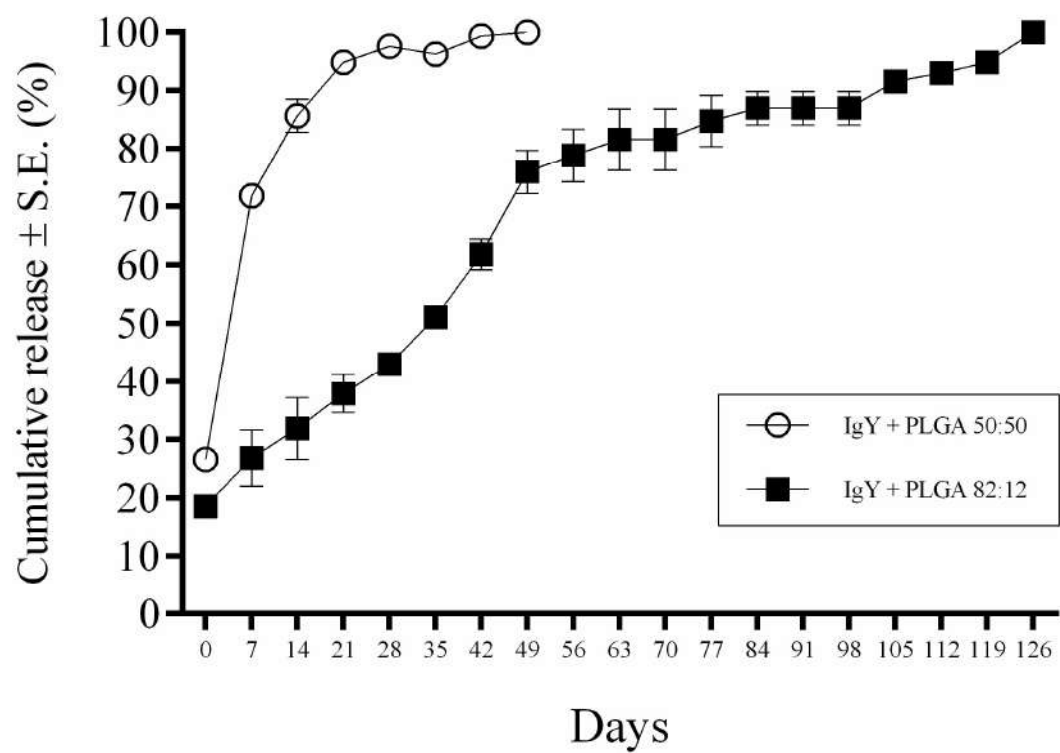
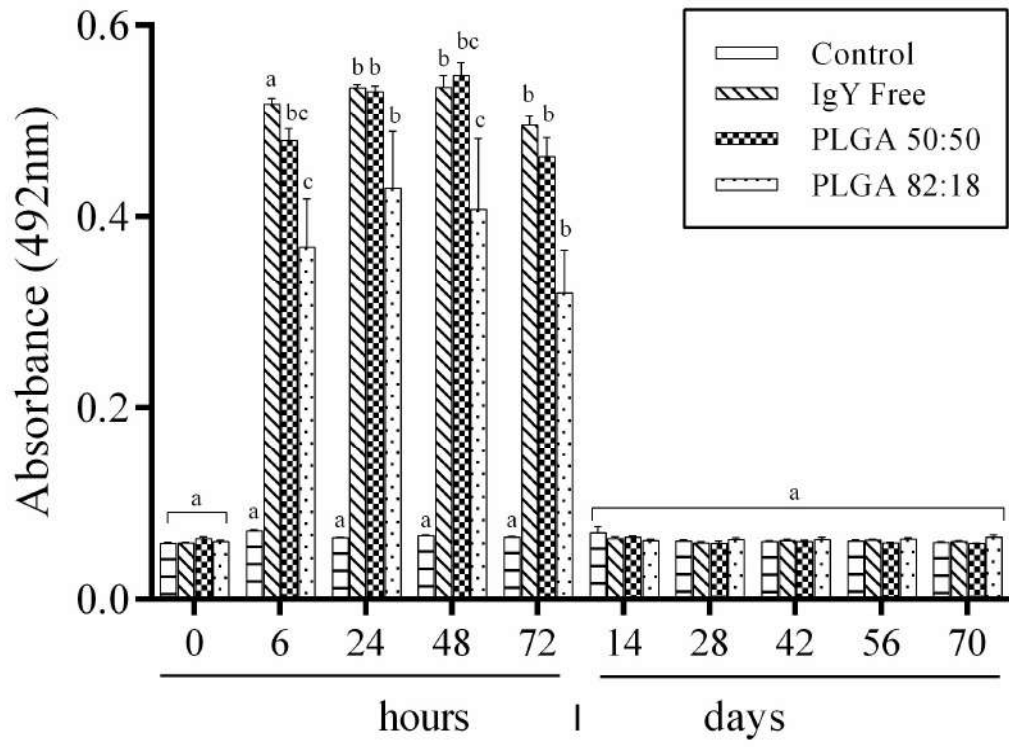


Fig. 3



5 DISCUSSÃO

Nesta tese, buscou-se abordar formas sustentáveis de possíveis estratégias de controle da hemonose. No primeiro artigo, utilizamos extratos de cogumelos comestíveis para determinar o potencial nematicida sobre diferentes estágios biológicos de *H. contortus*. A literatura abrange a capacidade desses cogumelos em controlar outras espécies de nematoides, mas principalmente nematoides de vida livre, parasitos que afetam plantas (SOARES et al., 2019; FERREIRA et al., 2019) e testes *in vitro* em parasitos de animais (LARSEN; NANSEN, 1991), nenhum estudo tinha abordado até o momento a utilização de *Pleurotus in vivo*. Em todos os testes *in vitro* o extrato de *P. ostreatus* demonstrou eficácia contra as fases de vida de *H. contortus*, no entanto os testes *in vivo* utilizando o modelo animal *M. unguiculatus* não obtiveram a mesma eficácia. Acredita-se que possivelmente as concentrações necessárias para obter eficácia deveriam ser maiores ou que de alguma forma esse extrato possa estar interagindo ou sendo degradado no sistema digestório do animal, antes mesmo de atuar sobre o parasito. Uma possível solução para esse problema seria a utilização de nanoemulsões, que poderiam veicular e proteger os princípios ativos do extrato para liberar os compostos no abomaso e afetar diretamente o parasito, como foi descrito em outros estudos (RIBEIRO et al., 2015; 2017). Além do mais, novos estudos também necessitam ser realizados no hospedeiro alvo, afim de determinar a melhor forma a ser utilizada.

No segundo artigo, buscamos determinar se nanoesferas de polímeros formado de ácido lático e ácido glicólico poderiam ser capazes de liberar de forma controlada imunoglobulinas Y produzidas a partir de antígenos de *H. contortus*. Utilizamos dois tipos de polímeros com histórico distintos de tempo de liberação com outras moléculas, PLGA 50:50 e 82:18. Na avaliação *in vitro* o PLGA 82:18 demonstrou uma capacidade de liberar de forma mais prolongada as IgYs, assim como em outros trabalhos (GAD; MCCORD, 2008). No entanto, quando testada a liberação *in vivo* não houve os mesmos resultados. É importante ressaltar que observamos diferenças com relação a imunoglobulina livre, que não passou por processo de nanoencapsulamento, mas a resposta não alcançou os resultados esperados comparável aos resultados *in vitro*. Com isso, é necessário que novos estudos sejam realizados afim de determinar se outros protocolos de nanoencapsulamento podem melhorar a eficiência e liberação das imunoglobulinas por um período mais longo. A perspectiva a partir desse estudo é produzir um imunoterápico contra antígenos específicos do parasito e que estruturas manométricas como nanoesferas produzidas com polímeros sejam capazes de liberar por longos períodos as imunoglobulinas na corrente sanguínea dos animais à medida que os mesmos se

reinfectem com os nematoides no ambiente, para que a liberação das imunoglobulinas se tornem um controle contínuo por meses.

Esses dois trabalhos podem trazer duas novas estratégias de possíveis alternativas no controle de *H. contortus* que atualmente são pouco estudadas, novas investigações são necessárias para aprofundar e aprimorar essas estratégias que visam reduzir a dependência de drogas sintéticas no controle de *H. contortus*.

6 CONCLUSÕES

Extrato aquoso de *P. ostreatus* demonstrou efeitos nematocidas em baixas concentrações contra os ovos e larvas de *H. contortus in vitro*.

Nanoesferas de PLGA têm a capacidade de servir como depósitos de anticorpos IgY e que as nanopartículas podem ser exploradas para a entrega de anticorpos direcionados *in vivo*. As nanoesferas de PLGA 82:18 foram capazes de liberar anticorpos de forma eficiente e por uma longa duração *in vitro*.

De forma geral mais estudos devem ser realizados para revelar o efeito antiparasitário de *P. ostreatus* em hospedeiros naturais, assim como mais estudos necessitam ser conduzidos para aumentar a eficiência de encapsulamento das nanoesferas de PLGA carregadas com IgY e avaliar a resposta das formulações no hospedeiro alvo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKITA, E. M. et al. Evaluation of allergenicity of egg yolk immunoglobulin Y and other egg proteins by passive cutaneous anaphylaxis. **Food and Agricultural Immunology**, v. 11, n. 2, p. 191-201, 1999.
- AKITA, E. M.; NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. **Journal of Immunological Methods**, v. 160, n. 2, p. 207–214, 1993.
- ALDAZ-MERCHÁN, L. E. **Evaluación de la actividad nematocida de los extractos acetónico y metanólico de (*Pleurotus ostreatus*)**. 66 f. Trabajo de conclusión de curso, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2018.
- ALMEIDA, C. M. et al. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. **The Veterinary Record**, v. 143, n. 21, p. 579–584, 1998.
- ALMEIDA, C. M. C. et al. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. **Toxicon**, v. 52, n. 2, p. 293–301, 2008.
- ALVEAR-DÍAZ, L. V. **Evaluación de la actividad nematocida del hongo *Pleurotus ostreatus* in vitro en diferentes concentraciones sobre dos especies de nematodos.** 2018. 82 f. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2018.
- AMARANTE, A. F. T. **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle**. 1º ed. Brasília – Distrito Federal, 2009.
- ANDERSON, J. M.; SHIVE, M. S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, n. 1, p. 5–24, 1997.
- ANDRE, W. P. P. et al. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. **Veterinary Parasitology**, v. 218, p. 52–58, 2016.
- ARAÚJO, A. S. et al. Brazilian IgY-Bothrops antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 739–744, 2010.
- ARECE-GARCÍA, J. et al. Evaluation of strategic and selective anthelmintic treatments on *Pelibuey* ewes in Cuba. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 27, n. 4, p. 273–281, 2014.
- ARMAS-TIZAPANTZI, A. et al. Estructuras tipo toxocistos en *Pleurotus ostreatus* y *P. pulmonarius*. **Scientia Fungorum**, v. 49, p. 1250, 2019.
- ASSIS, R. C. L. et al. Comparison between the action of nematode predatory fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* in the biological control of bovine gastrointestinal nematodiasis in tropical southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 1–3, p. 134–140, 2013.
- ASTETE, C. E.; SABLIOV, C. M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 17, n. 3, p. 247–289, 2006.
- BALOYI, M. A.; LAING, M. D.; YOBO, K. S. Use of mixed cultures of biocontrol agents to control sheep nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 2–4, p. 367–370, 2012.
- BASSETTO, C. C. et al. Attempts to vaccinate ewes and their lambs against natural infection

- with *Haemonchus contortus* in a tropical environment. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 14, p. 1049–1054, 2014.
- BASSETTO, C. C. et al. Protection of calves against *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* after immunization with gut membrane proteins from *H. contortus*. **Parasite Immunology**, v. 33, n. 7, p. 377–381, 2011.
- BENAVIDES, M. V.; SONSTEGARD, T. S.; VAN TASSELL, C. Genomic regions associated with sheep resistance to gastrointestinal nematodes. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 6, p. 470–480, 2016.
- BERNHISEL-BROADBENT, J.; YOLKEN, R. H.; SAMPSON, H. A. Allergenicity of orally administered immunoglobulin preparations in food-allergic children. **Pediatrics**, v. 87, n. 2, p. 208–214, 1991.
- BESIER, R. B. Refugia-based strategies for sustainable worm control: factors affecting the acceptability to sheep and goat owners. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 1–2, p. 2–9, 2012.
- BOA, E. R. **Wild edible fungi: a global overview of their use and importance to people**. Food & Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 2004.
- BOWMAN, D.; LYNN, R.; EBERHARD, M. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. Elsevier Health Sciences Brazil, 2010.
- BRITT, D. P. Levamisole-resistant nematodes. **Veterinary Record**, v. 118, n. 16, p. 467–467, 1986.
- BURKE, J. M.; MILLER, J. E. Sustainable approaches to parasite control in ruminant livestock. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 36, n. 1, p. 89–107, 2020.
- CACHAT, E. et al. Attempts to immunize sheep against *Haemonchus contortus* using a cocktail of recombinant proteases derived from the protective antigen, H-gal-GP. **Parasite Immunology**, v. 32, n. 6, p. 414–419, 2010.
- CAZAJOUS, T. et al. Multiple-resistance to ivermectin and benzimidazole of a *Haemonchus contortus* population in a sheep flock from mainland France, first report. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 14, p. 103–105, 2018.
- CEDILLO, C. **Estudio químico biodirigido del extracto hidroalcohólico del hongo *Pleurotus ostreatus* con actividad nematocida contra *Haemonchus contortus***. Trabajo de conclusión de curso. 63 f. Universidad Politécnica del Estado de Morelos, 2016.
- CELI, P. et al. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: new opportunities for sustainable animal production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 234, p. 88–100, 2017.
- CHANDRAWATHANI, P.; ADNAN, M.; WALLER, P. J. Anthelmintic resistance in sheep and goat farms on Peninsular Malaysia. **Veterinary Parasitology**, v. 82, n. 4, p. 305–310, 1999.
- CHANG, H. M. et al. Productivity and Some Properties of Immunoglobulin Specific against *Streptococcus mutans* Serotype c in Chicken Egg Yolk (IgY). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 61–66, 1999.
- CHIOU, V. Y.-N. The development of IgY (Δ Fc) antibody based neuro toxin antivenoms and the study on their neutralization efficacies. **Clinical Toxicology**, v. 46, n. 6, p. 539–544,

2008.

CINTRA, M. C. R. et al. Lack of efficacy of monepantel against *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 216, p. 4-6, 2016.

CRUZ-AREVALO, J. et al. An anthelmintic fraction of *Pleurotus eryngii* against *Haemonchus contortus* nematode. **BioMed Research International**, p. 4138950, 2020.

CRUZ, L. J. et al. Targeted PLGA nano-but not microparticles specifically deliver antigen to human dendritic cells via DC-SIGN *in vitro*. **Journal of Controlled Release**, v. 144, n. 2, p. 118-126, 2010.

DESHMUKH, R.; KHARDENAVIS, A. A.; PUROHIT, H. J. Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. **Indian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 247-264, 2016.

DEY, A. R. et al. Multiple anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of small ruminants in Bangladesh. **Parasitology International**, v. 77, p. 102105, 2020.

DOMKE, A. V. M. et al. Prevalence of gastrointestinal helminths, lungworms and liver fluke in sheep and goats in Norway. **Veterinary Parasitology**, v. 194, n. 1, p. 40-8, 1 maio 2013.

DRUDGE, J. H. et al. Field studies on parasite control in sheep: comparison of thia-bendazole, ruelene, and phenothiazine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 25, n. 108, p. 1512-1518, 1964.

FAHMY, T. M. et al. Design opportunities for actively targeted nanoparticle vaccines. **Nanomed.**, v. 3, p. 343-355, 2008.

FALZON, L. C. et al. Anthelmintic resistance in sheep flocks in Ontario, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 1-3, p. 150-162, 2013.

FAWZI, E. M. et al. Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* infection with a somatic protein (Hc23) from adult helminths. **International journal for parasitology**, v. 44, n. 7, p. 429-36, jun. 2014.

FERNANDES, L. H. et al. Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas. Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 6, p. 733-740, 2004.

FERREIRA, J. M. et al. First report of the nematicidal activity of *Flammulina velutipes*, its spent mushroom compost and metabolites. **3 Biotech**, v. 9, n. 11, p. 410, 2019.

FREITAS SOARES, F. E. et al. Proteolytic and nematicidal potential of the compost colonized by *Hypsizygus marmoreus*. **Experimental Parasitology**, v. 197, p. 16-19, 2019.

GAD, S. C.; MCCORD, M. G. **Safety evaluation in the development of medical devices and combination products**. (third ed.), CRC Press, Boca Raton (2008).

GASSMANN, M. et al. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **The FASEB Journal**, v. 4, n. 8, p. 2528-2532, 1990.

GERDTS, V. Adjuvants for veterinary vaccines--types and modes of action. **Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift**, v. 128, n. 11-12, p. 456-463, 2015.

GRESSLER, L. T. **Produção de imunoglobulina Y anti-*Haemonchus contortus* e Aplicação imunoterápica em *Meriones unguiculatus***. 2018. 103 f. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Santa Maria, 2018.

- GUO, Z. et al. Possible mechanisms of host resistance to *Haemonchus contortus* infection in sheep breeds native to the Canary Islands. **Scientific reports**, v. 6, p. 26200, 2016.
- GOMIERO, T.; PIMENTEL, D.; PAOLETTI, M. G. Environmental impact of different agricultural management practices: conventional vs. organic agriculture. **Critical reviews in plant sciences**, v. 30, n. 1–2, p. 95–124, 2011.
- HATTA, H. et al. Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzymes. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 57, n. 7, p. 1077–1081, 1993.
- HEYDARI, R.; POURJAM, E.; GOLTAPPEH, E. M. Antagonistic effect of some species of *Pleurotus* on the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* *in vitro*. **Plant Pathology Journal**, v. 5, n. 2, p. 173–177, 2006.
- HODGKINSON, J. E. et al. Refugia and anthelmintic resistance: Concepts and challenges. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 10, p. 51–57, 2019.
- HOSTE, H. et al. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 1–2, p. 18–27, 2012.
- HOSTE, H. et al. Interactions between nutrition and infections with *Haemonchus contortus* and related gastrointestinal nematodes in small ruminants. **Adv. Parasitol.**, v. 93. p. 239–351, 2016.
- IGARASHI, M. et al. Efeito do neem (*Azadirachta indica*) no controle de nematódeos gastrintestinais em ovinos suplementados a pasto no período seco. **Revista Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, 2013.
- JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2475–2490, 2000.
- JESUS, A. P. et al. Controle biológico da verminose ovina com o uso de fungos nematófagos. **III Jornada de Iniciação Científica da UENP, 2013**, v. Cornélio P, p. Anais do III JOIC, 2013.
- JOHNSON, P. T. J. et al. When parasites become prey: ecological and epidemiological significance of eating parasites. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 6, p. 362–371, 2010.
- KANCHAN, V.; PANDA, A. K. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. **Biomaterials**, v. 28, n. 35, p. 5344–5357, 2007.
- KARAKAŞ, M. Nematode-destroying fungi: infection structures, interaction mechanisms and biocontrol. **Communications Faculty of Sciences University of Ankara Series C Biology**, v. 29, n. 1, p. 176–201, 2020.
- KATARE, Y. K.; MUTHUKUMARAN, T.; PANDA, A. K. Influence of particle size, antigen load, dose and additional adjuvant on the immune response from antigen loaded PLA microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, n. 1–2, p. 149–160, 2005.
- KEARNEY, P. E. et al. The ‘Toolbox’ of strategies for managing *Haemonchus contortus* in goats: What’s in and what’s out. **Veterinary Parasitology**, v. 220, p. 93–107, 2016.
- KENYON, F. et al. The role of targeted selective treatments in the development of refugia-

based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 1, p. 3–11, 2009.

KHAN, F. A. et al. Effect of dietary protein on responses of lambs to repeated *Haemonchus contortus* infection. **Livestock Science**, v. 150, n. 1–3, p. 143–151, 2012.

KIM, H.; NAKAI, S. Simple separation of immunoglobulin from egg yolk by ultrafiltration. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 3, p. 485–490, 1998.

KNOX, M. R.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; AGUILAR-CABALLERO, A. J. Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 385–393, 2006.

KOLLBERG, H. et al. Oral administration of specific yolk antibodies (IgY) may prevent *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis: a phase I feasibility study. **Pediatric pulmonology**, v. 35, n. 6, p. 433–440, 2003.

KONG, C. et al. Evaluation of Stropharia sp. 1.2052 nematicidal effects against *Meloidogyne incognita* on tomato. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 50, p. 5737–5741, 2013.

KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Microencapsulation for the gastric passage and controlled intestinal release of immunoglobulin Y. **Journal of Immunological Methods**, v. 296, n. 1, p. 199–209, 2005.

KRÜGER, C. et al. The effects of egg-derived antibodies to glucosyltransferases on dental caries in rats. **Caries Research**, v. 38, n. 1, p. 9–14, 2004.

KWOK, O. C. H. et al. A nematicidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. **Journal of Chemical Ecology**, v. 18, n. 2, p. 127–136, 1992.

LAGARES, A. F. B. F. **Parasitoses de pequenos ruminantes na região da Cova da Beira**. 2008. 115 f. Universidade Técnica de Lisboa, 2008.

LAMB, J. et al. Broad spectrum anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in Northern NSW of Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 241, p. 48–51, 2017.

LARSEN, M.; NANSEN, P. Ability of the fungus *Pleurotus pulmonarius* to immobilise preparasitic nematode larvae. **Research in Veterinary Science**, v. 51, n. 3, p. 246–249, 1991.

LEE, K. et al. Acid stability of Anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. **BMB Reports**, v. 35, n. 5, p. 488–493, 2002.

LEE, S. H. et al. Induction of passive immunity in broiler chickens against *Eimeria acervulina* by hyperimmune egg yolk immunoglobulin Y. **Poultry Science**, v. 88, n. 3, p. 562–566, 2009.

LELEUX, J.; ROY, K. Micro and nanoparticle-based delivery systems for vaccine immunotherapy: an immunological and materials perspective. **Advanced Healthcare Materials**, v. 2, n. 1, p. 72–94, 2013.

LESLIE, G. A.; CLEM, L. W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function: III. Immunoglobulins of the chicken. **Journal of Experimental Medicine**, v. 130, n. 6, p. 1337–1352, 1969.

LI, G. et al. Nematicidal metabolites from the fungus *Pleurotus ferulae* Lenzi. **Annals of Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 527, 2007.

- LI, X.-Y. et al. Chitosan–alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): in vivo evaluation in a pig model of enteric colibacillosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 129, n. 1–2, p. 132–136, 2009.
- LIMA, W. C. et al. Nematoides resistentes a alguns anti-helminticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 30, n. 12, p. 1003–1009, 2010.
- LIU, S.; DONG, W.; KONG, T. Preparation and characterization of immunoglobulin yolk against the venom of *Naja naja* atra. **Indian Journal Experimental Biologic**. v. 48, n. 8, p. 778-785, 2010.
- LUNDQVIST, M. L. et al. Immunoglobulins of the non-galliform birds: antibody expression and repertoire in the duck. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 30, n. 1–2, p. 93–100, 2006.
- MACARTHUR, F. A.; KAHN, L. P.; WINDON, R. G. Immune response of twin-bearing Merino ewes when infected with *Haemonchus contortus*: effects of fat score and prepartum supplementation. **Livestock Science**, v. 157, n. 2–3, p. 568–576, 2013.
- MAHIEU, M. et al. Evaluation of targeted drenching using Famacha© method in Creole goat: reduction of anthelmintic use, and effects on kid production and pasture contamination. **Veterinary Parasitology**, v. 146, n. 1–2, p. 135–147, 2007.
- MAIA, D. et al. Assessment of a hands-on method for FAMACHA© system training. **Veterinary Parasitology**, v. 200, n. 1–2, p. 165–171, 2014.
- _____. FAMACHA© system assessment by previously trained sheep and goat farmers in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 209, n. 3–4, p. 202–209, 2015.
- MALEKSHAHI, Z. V et al. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in mice with oral administration of egg yolk-driven anti-UreC immunoglobulin. **Microbial Pathogenesis**, v. 51, n. 5, p. 366–372, 2011.
- MATOS, A. F. I. M. de et al. Attempt to control *Haemonchus contortus* in dairy goats with Barbervax®, a vaccine derived from the nematode gut membrane glycoproteins. **Small Ruminant Research**, v. 151, p. 1–4, 2017.
- MCMANUS, C. et al. Selection methods for resistance to and tolerance of helminths in livestock. **Parasite**, v. 21, 2014.
- MCKELLAR, Q. A.; JACKSON, F. Veterinary anthelmintics: old and new. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 10, p. 456-461, 2004.
- MEENATCHISUNDARAM, S. et al. Neutralization of the pharmacological effects of Cobra and *Krait venoms* by chicken egg yolk antibodies. **Toxicon**, v. 52, n. 2, p. 221–227, 2008a.
- _____. Studies on pharmacological effects of Russell’s viper and Saw-scaled viper venom and its neutralization by chicken egg yolk antibodies. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 8, p. 1067–1073, 2008b.
- MEIER, L.; TORGERSON, P. R.; HERTZBERG, H. Vaccination of goats against *Haemonchus contortus* with the gut membrane proteins H11/H-gal-GP. **Veterinary Parasitology**, v. 229, p. 15–21, 2016.
- MELO, A. C. F. L. et al. 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, 2003.

- MEULENAER, B.; HUYGHEBAERT, A. Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins: A review. **Food and Agricultural Immunology**, v. 13, n. 4, p. 275–288, 2001.
- MILES, P. G.; CHANG, S.-T. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. 1 ed., CRC Press, Boca Raton, 2004.
- MOHAMMADI-SAMANI, S.; TAGHIPOUR, B. PLGA micro and nanoparticles in delivery of peptides and proteins; problems and approaches. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 20, n. 4, p. 385–393, 2015.
- MOLENTO, M. B. et al. Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1, p. 126–132, 2011.
- MOLENTO, M B et al. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, p. 253–263, 2013.
- MOLENTO, M. B.; BUZZATTI, A.; SPRENGER, L. K. Pasture larval count as a supporting method for parasite epidemiology, population dynamic and control in ruminants. **Livestock Science**, v. 192, p. 48–54, 2016.
- MOWSURNI, F. R.; CHOWDHURY, M. B. K. Oyster mushroom: Biochemical and medicinal prospects. **Bangladesh Journal of Medical Biochemistry**, v. 3, n. 1, p. 23–28, 2010.
- MOYLE, P. M.; TOTH, I. Modern subunit vaccines: development, components, and research opportunities. **ChemMedChem**, v. 8, n. 3, p. 360–376, 2013.
- MUCHIUT, S. M. et al. Anthelmintic resistance: Management of parasite refugia for *Haemonchus contortus* through the replacement of resistant with susceptible populations. **Veterinary Parasitology**, v. 254, p. 43–48, 2018.
- MULVEY, G. L. et al. Therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Clostridium difficile* infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 8, p. 1181–1187, 2011.
- MUNDARGI, R. C. et al. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly (D, L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. **Journal of Controlled Release**, v. 125, n. 3, p. 193–209, 2008.
- NARDONE, A. et al. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. **Livestock Science**, v. 130, n. 1–3, p. 57–69, 2010.
- NIELSEN, M. K. et al. Anthelmintic resistance in equine parasites - Current evidence and knowledge gaps. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 1–2, p. 55–63, 2014.
- ONYIAH, L. C.; ARSLAN, O. Simulating the development period of a parasite of sheep on pasture under varying temperature conditions. **Journal of Thermal Biology**, v. 30, n. 3, p. 203–211, abr. 2005.
- PARIZI, L. F. et al. The quest for a universal vaccine against ticks: cross-immunity insights. **The Veterinary Journal**, v. 194, n. 2, p. 158–165, 2012.
- PARK, A. W. et al. Refugia and the evolutionary epidemiology of drug resistance. **Biology Letters**, v. 11, n. 11, p. 20150783, 2015.
- PATRAVALE, V.; PRABHU, P. Potential of nanocarriers in antigen delivery: the path to successful vaccine delivery. **Nanocarriers**, v. 1, n. 1, 2014.

- PATTERSON, R. et al. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. **The Journal of Immunology**, v. 89, n. 2, p. 272–278, 1962.
- PAUL, K. et al. Anti-Echis carinatus venom antibodies from chicken egg yolk: isolation, purification and neutralization efficacy. **Toxicon**, v. 50, n. 7, p. 893–900, 2007.
- PAULY, D. et al. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. **Poultry Science**, v. 88, n. 2, p. 281–290, 2009.
- PAULY, D. et al. IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 51, p. e3084, 2011.
- PEACOCK, C.; SHERMAN, D. M. Sustainable goat production - Some global perspectives. **Small Ruminant Research**, v. 89, n. 2–3, p. 70–80, 2010.
- PINEDA-ALEGRÍA, J. A. et al. *In vitro* nematocidal activity of commercial fatty acids and β -sitosterol against *Haemonchus contortus*. **Journal of Helminthology**, v. 94, 2020.
- PINEDA-ALEGRÍA, J. A. et al. The edible mushroom *Pleurotus djamor* produces metabolites with lethal activity against the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. **Journal of Medicinal Food**, v. 20, n. 12, p. 1184–1192, 2017.
- RADDY, H. M. et al. Efficacy of six nematicides and six commercial bioproducts against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 9, n. 7, p. 4410–4417, 2013.
- RAGHUVANSHI, R. S. et al. Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 245, n. 1–2, p. 109–121, 2002.
- RANA, M. S. et al. Reducing veterinary drug residues in animal products: A review. **Food Science of Animal Resources**, v. 39, n. 5, p. 687, 2019.
- REIS, I. F. **Controle de nematóides gastrintestinais em pequenos ruminantes: método estratégico versus Famacha®**. 79p. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2004.
- REYES, Z. M. E. et al. Genetic markers identification and genotyping for resistance to internal parasites in sheep and goat infected with *Haemonchus contortus*. **Journal of Animal Science**, v. 94, p. 159–160, 2016.
- RIBEIRO, W. L. C et al. The use of *Eucalyptus staigeriana* nanoemulsion for control of sheep haemonchosis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 3, p. 221–226, 2017.
- RIBEIRO, W. L. C et al. In vitro effects of *Eucalyptus staigeriana* nanoemulsion on *Haemonchus contortus* and toxicity in rodents. **Veterinary Parasitology**, v. 212, n. 3–4, p. 444–447, 2015.
- RILEY, D. G.; VAN WYK, J. A. Genetic parameters for FAMACHA® score and related traits for host resistance/resilience and production at differing severities of worm challenge in a *Merino* flock in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 1, p. 44–52, 2009.
- RINALDI, L; CRINGOLI, G. Parasitological and pathophysiological methods for selective application of anthelmintic treatments in goats. **Small Ruminant Research**, v. 103, n. 1, p. 18–22, 2012.

- RINALDI, L.; VENEZIANO, V.; CRINGOLI, G. Dairy goat production and the importance of gastrointestinal strongyle parasitism. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 8, p. 745–746, 2007.
- ROBLES, C. Sanitary aspects in small ruminants in extensive systems in South America. **Revista Argentina de Producción Animal**, v. 37, n. Especial 1, p. 5–8, 2017.
- RODRIGUES, A. B. et al. Sensibilidade dos nematoides gastrintestinais de caprinos a anti-helminticos na mesorregião do Sertão Paraibano. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 162–166, 2007.
- SADDIQUI, H A et al. Evaluation of three Pakistani sheep breeds for their natural resistance to artificial infection of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 1–2, p. 141–145, 2010.
- SADDIQUI, H. A. et al. Small ruminant resistance against gastrointestinal nematodes: a case of *Haemonchus contortus*. **Parasitology Research**, v. 109, n. 6, p. 1483–1500, 2011.
- SAGÜÉS, M. F. et al. Efficacy of an energy block containing *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of sheep. **Parasitology Research**, v. 109, n. 3, p. 707–713, 2011.
- SALVADOR, A. et al. An overview on the field of micro-and nanotechnologies for synthetic peptide-based vaccines. **Journal of Drug Delivery**, v. 2011, 2011.
- SAMADI, N. et al. The effect of lauryl capping group on protein release and degradation of poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) particles. **Journal of controlled release**, v. 172, n. 2, p. 436–443, 2013.
- SAMPAIO, L. C. L. **Imunoterapia com igY aviária em ratos experimentalmente infectados por Trypanosoma evansi**. 113p. Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, 2014.
- SÁNCHEZ, C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1321–1337, 2010.
- SANDOVAL-CASTRO, C. A. et al. Using plant bioactive materials to control gastrointestinal tract helminths in livestock. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, n. 1–4, p. 192–201, 2012.
- SANTOS, M. C.; SILVA, B. F.; AMARANTE, A. F. T. Environmental factors influencing the transmission of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 3–4, p. 277–284, 2012.
- SANTOS, J. M. L. et al. High levels of benzimidazole resistance and β -tubulin isotype 1 SNP F167Y in *Haemonchus contortus* populations from Ceará State, Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 146, p. 48–52, 2017.
- SARDAR, H. et al. Agro-industrial residues influence mineral elements accumulation and nutritional composition of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*). **Scientia Horticulturae**, v. 225, p. 327–334, 2017.
- SARKER, S. A. et al. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 19–25, 2001.
- SCHADE, R. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in

production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 33, n. 2, p. 129–154, 2005.

SCHNYDER, M. et al. Multiple anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* isolated from South African Boer goats in Switzerland. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 3, p. 285–290, 2005.

SELEMON, M. Review on control of *Haemonchus contortus* in sheep and goat. **Journal of Veterinary Medicine and Research**, 2018.

SILVA, B. F. et al. Efficacy of *Duddingtonia flagrans* and *Arthrobotrys robusta* in controlling sheep parasitic gastroenteritis. **Parasitology research**, v. 106, n. 6, p. 1343–1350, 2010.

SILVA, M. E. da et al. Predatory activity of *Butlerius* nematodes and nematophagous fungi against *Haemonchus contortus* infective larvae. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 1, p. 92–95, 2017.

SILVA, W. W.; BEVILAQUA, C. M. L.; RODRIGUES, M. D. E. L. D. E. a. Variação sazonal de nematóides gastrintestinais em caprinos traçadores no semi-árido Paraibano - Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 75, p. 71–75, 2003.

SIDAN - SINDICATO DAS INDÚSTRIAS DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL. **Mercado Veterinário**, 2014. Acesso em: 02 ago. 2020.

TERRILL, T. H. et al. Anthelmintic resistance on goat farms in Georgia: Efficacy of anthelmintics against gastrointestinal nematodes in two selected goat herds. **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 4, p. 261–268, 2001.

SINGH, D.; SWARNKAR, C. P. Evaluation of targeted selective treatment strategy in sheep farm of Rajasthan. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 82, n. 7, p. 679–686, 2012.

SINGH, S. et al. Effect of tanniferous leaf meal based multi-nutrient blocks on feed intake, hematological profile, immune response, and body weight changes in *Haemonchus contortus* infected goats. **Veterinary World**, v. 8, n. 5, p. 572, 2015.

SLÜTTER, B. et al. Mechanistic study of the adjuvant effect of biodegradable nanoparticles in mucosal vaccination. **Journal of Controlled Release**, v. 138, n. 2, p. 113–121, 2009.

SMITH, W. D.; PETTIT, D.; SMITH, S. K. Cross-protection studies with gut membrane glycoprotein antigens from *Haemonchus contortus* and *Teladorsagia circumcincta*. **Parasite Immunology**, v. 23, n. 4, p. 203–211, 2001.

SODER, K. J.; HOLDEN, L. A. Use of nematode-trapping fungi as a biological control in grazing livestock. **The Professional Animal Scientist**, v. 21, n. 1, p. 30–37, 2005.

SPILLNER, E. et al. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. **Biologicals**, v. 40, n. 5, p. 313–322, 2012.

STAAK, C. et al. Isolation of IgY from yolk. **Chick. egg yolk antibodies, Prod. Appl.** Springer, Berlin, Heidelberg, 2001. p. 65-107.

STADLER, M. et al. Fatty acids and other compounds with nematicidal activity from cultures of Basidiomycetes. **Planta Medica**, v. 60, n. 02, p. 128–132, 1994.

STAMETS, P. E. **Antiviral and antibacterial activity from medicinal mushrooms**. United States Patent Application Publication US, 201440105928, 2014.

- SUFIA TE, B. L. et al. Nematicidal action of *Pleurotus eryngii* metabolites. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, p. 216–219, 2017.
- SUN, S. et al. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, n. 9, p. 708–712, 2001.
- TARIQ, K. A. A review of the epidemiology and control of gastrointestinal nematode infections of small ruminants. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 85, n. 2, p. 693–703, 2015.
- TAYLOR MA, COOP RL, WALL RL. **Veterinary Parasitology**. 3 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007.
- TERRILL, T. H. et al. Experiences with integrated concepts for the control of *Haemonchus contortus* in sheep and goats in the United States. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 1–2, p. 28–37, 2012.
- THAKOR, P. et al. Polymer–drug conjugates: recent advances and future perspectives. **Drug Discovery Today**, 2020.
- THOMAS, C.; GUPTA, V.; AHSAN, F. Particle size influences the immune response produced by hepatitis B vaccine formulated in inhalable particles. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 905–919, 2010.
- THORN, R. G.; BARRON, G. L. Carnivorous mushrooms. **Science**, v. 224, n. 4644, p. 76–78, 1984.
- TINI, M. et al. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comparative Biochemistry and Physiology part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 131, n. 3, p. 569–574, 2002.
- TORCHÉ, A.-M. et al. Immune responses after local administration of IgY loaded-PLGA microspheres in gut-associated lymphoid tissue in pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 109, n. 3–4, p. 209–217, 2006.
- TORRES-ACOSTA, J. F. J. et al. Building a combined targeted selective treatment scheme against gastrointestinal nematodes in tropical goats. **Small Ruminant Research**, v. 121, n. 1, p. 27–35, 2014.
- TORRES-ACOSTA, J. F. J.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 77, n. 2–3, p. 159–173, jul. 2008.
- TRUONG, B.-N. et al. Characterization of the nematocidal toxocyst in *Pleurotus subgen. Coremiopleurotus*. **Mycoscience**, v. 48, n. 4, p. 222–230, 2007.
- UHRICH, K. E. et al. Polymeric systems for controlled drug release. **Chemical reviews**, v. 99, n. 11, p. 3181–3198, 1999.
- URQUHART, G. M.; ACEDO, C. S. **Parasitología Veterinaria**. Acribia, Editorial, S.A., 2001. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=m128AAAACAAJ>>.
- VAN WYK, J. A.; BATH, G. F. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. **Veterinary Research**, v. 33, n. 5, p. 509–29, jan. 2002.
- VEGA, C. G. et al. IgY antibodies protect against human Rotavirus induced diarrhea in the

- neonatal gnotobiotic piglet disease model. **PloS One**, v. 7, n. 8, p. e42788, 2012.
- VIEIRA, L. S. et al. *Haemonchus contortus* resistance to ivermectin and netobimin in Brazilian sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 45, n. 1-2, p. 111-116, 1992.
- VIEIRA, V. D. et al. Sheep gastrointestinal helminthiasis in the sertão region of Paraíba State, Northeastern Brazil: prevalence and risk factors. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 4, p. 488–494, 2014.
- VIEIRA, T. M. et al. Control of *Haemonchus contortus* in sheep using basidiocarps of *Agaricus blazei* Murril. **Veterinary Research Communications**, v. 41, n. 2, p. 99–106, 2017.
- VILELA, V. L. R. et al. Biological control of goat gastrointestinal helminthiasis by *Duddingtonia flagrans* in a semi-arid region of the northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 1–2, p. 127–133, 2012.
- VILLALBA, J. J. et al. Selection of tannins by sheep in response to gastrointestinal nematode infection. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 6, p. 2189–2198, 2010.
- VUORELA, P. et al. Natural products in the process of finding new drug candidates. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1375–1389, 2004.
- WALLER, P. J. Sustainable helminth control of ruminants in developing countries. **Veterinary Parasitology**, v. 71, n. 2–3, p. 195–207, 1997.
- WARR, G. W.; MAGOR, K. E.; HIGGINS, D. A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today**, v. 16, n. 8, p. 392–398, 1995.
- WILLE, C. N. et al. Potential of aqueous extracts of basidiomycetes to control root-knot nematodes on lettuce. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 54–59, 2019.
- YOO, J. Y. et al. Characterization of degradation behavior for PLGA in various pH condition by simple liquid chromatography method. **Bio-medical Materials and Engineering**, v. 15, n. 4, p. 279–288, 2005.
- ZOLNIK, B. S.; BURGESS, D. J. Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. **Journal of Controlled Release**, v. 122, n. 3, p. 338–344, 2007.