

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

Marjorie de Giacometi

**ATIVIDADE *IN VITRO* DE *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus  
florida* e *Pleurotus djamor* EM OVOS DE  
CIATOSTOMÍNEOS DE EQUINOS**

Santa Maria, RS  
2020

**Marjorie de Giacometi**

**ATIVIDADE *IN VITRO* DE *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida* e *Pleurotus djamor* EM OVOS DE CIATOSTOMÍNEOS DE EQUINOS**

Dissertação apresentada ao 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 título de **Mestre em Medicina Veterinária**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Gonzalez Monteiro

Santa Maria, RS  
2020

de Giacometi, Marjorie  
ATIVIDADE IN VITRO DE Pleurotus ostreatus, Pleurotus  
florida e Pleurotus djamor EM OVOS DE CIATOSTOMÍNEOS DE  
EQUINOS / Marjorie de Giacometi.- 2020.  
45 p.; 30 cm

Orientadora: Silvia Gonzalez Monteiro  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2020

1. Equinos 2. ciatostomíneos 3. Pleurotus spp. 4.  
extrato aquoso 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.

---

© 2020

Todos os direitos autorais reservados a Marjorie de Giacometi. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Fone: (49) 998041572 - e-mail: marjorie.giacometi@gmail.com

---

Marjorie de Giacometi

**ATIVIDADE *IN VITRO* DE *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida* e *Pleurotus djamor* EM OVOS DE CIATOSTOMÍNEOS DE EQUINOS**

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

**Aprovado em 5 de março de 2020**

---

**Silvia Gonzalez Monteiro, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**  
**(Presidente, orientadora)**

---

**Matheus Dellaméa Baldissera (UFSM)**

---

**Aline Ferreira Ourique (UFN)**

Santa Maria, RS

2020

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me dar forças necessárias para chegar até aqui e permitir que alcançasse meus objetivos de forma honesta e sincera.

Aos meus pais Dirlei Mozzer Giacometi e Airton de Giacometi que sempre fizeram de tudo por mim e estavam comigo nos piores e melhores momentos da minha vida, por todo conhecimento repassado e principalmente pelos ensinamentos que jamais serão esquecidos.

A equipe LAPAVET, onde fui bem recebida, fiz amigos maravilhosos que me apoiaram durante toda a trajetória.

Ao CNPQ, por possibilitar a execução deste trabalho por meio da bolsa a mim concedida, permitindo minha total dedicação ao Curso de Pós-Graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFSM, por permitir a realização de mais uma etapa de minha vida profissional.

Aos amigos e familiares que tornaram meus dias mais felizes e de certa forma me ajudaram a chegar até aqui.

Obrigada a todos! Vocês têm grande parte nisso.

*“Uma vez eliminado o impossível, o que resta,  
por mais improvável que seja, deve ser a  
verdade.” -  
Arthur Conan Doyle*

## RESUMO

### **Atividade *in vitro* de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus djamor* em ovos de ciatostomíneos de equinos**

AUTOR: Marjorie de Giacometi

ORIENTADORA: Silvia Gonzalez Monteiro

O Brasil possui o terceiro maior rebanho de equinos do mundo, contando com 5 milhões de cabeça, gerando aproximadamente 7,5 bilhões por ano e conseqüentemente empregos diretos. Por esse motivo é importante manter a saúde e bem estar desses animais. No entanto, as doenças parasitárias em equinos atrasam seu desenvolvimento podendo levar o animal a óbito, ocasionando sérias perdas econômicas. A resistência antihelmíntica instalada em diversos rebanhos é um sério problema na medicina veterinária, uma vez que os tratamentos antiparasitários não surtem efeito esperado nessas infecções ou causam alta toxicidade no animal. O gênero *Pleurotus*, é um fungo conhecido mundialmente como shimeji, um cogumelo comestível que possui mais de 1000 espécies descritas. Sabe-se que esse fungo é capaz de produzir compostos bioativos que auxiliam no combate a patologias e melhoram o bem estar de pessoas, além de ser considerado um fungo nematófago capaz de produzir toxinas eficazes no controle de diversos parasitos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade de três espécies de *Pleurotus in vitro* sobre ovos de ciatostomíneos de equinos naturalmente infectados. Para esse experimento, foram realizados extratos aquosos das espécies *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida* e *Pleurotus djamor*. Os ovos de ciatostomíneos foram recuperados e incubados (27° C) juntamente com os extratos, nas concentrações crescentes de 0,62%, 1,25%, 2,5%, 5%, 10%. O grupo controle negativo foi realizado somente com água destilada. A leitura foi realizada após 48h em microscópio invertido. Todas as concentrações apresentaram efeitos na eclodibilidade. Observou-se que o *P. florida* foi mais efetivo que os demais *Pleurotus*, inibindo a eclodibilidade em até 92,19% na maior concentração (10%), com CL<sub>50</sub> de 2,13% (±0,12), já a inibição do *P. ostreatus* foi de 55,46%, com CL<sub>50</sub> 7,44% (±0,09), enquanto o *P. djamor* 23,67% na mesma concentração. A utilização desse fungo em ovos de ciatostomíneos *in vitro* demonstrou atividade ovicida sendo necessário maiores estudos a fim de verificar o seu potencial para uso em controle biológico desse nematoide.

**Palavras-chaves:** Equinos, ciatostomíneos, *Pleurotus* spp, controle biológico

## ABSTRACT

### ***In vitro* activity of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida* and *Pleurotus djamor* in equine cyathostomines eggs**

AUTHOR: Marjorie de Giacometi  
ADVISOR: Silvia Gonzalez Monteiro

Brazil has the third largest herd of horses in the world, with 5 million heads, generating approximately US \$ 7.5 billion per year and consequently using direct. For this reason, it is important to maintain the health and well being of these animals. However, parasitic diseases in horses delay their development and may lead the animal to death, causing serious economic losses. The anti-helminth resistance installed in several herds is a serious problem in veterinary medicine, since antiparasitic treatments do not have the expected effect on these infections or cause high toxicity in the animal. The fungus *Pleurotus* spp., known worldwide as “oyster mushroom”, an edible mushroom, has over 1000 species already described. It is known that this fungus is capable of producing bioactive compounds that help to combat pathologies and improve the well-being of people, in addition to being considered a nematophagous fungus capable of producing toxins effective in the control of various parasites. The object of this study was to evaluate the activity of different species of *Pleurotus* spp. *in vitro* on naturally infected equine cyathostomes eggs. In search of this, the aqueous extract of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida* and *Pleurotus djamor* were used. Eggs were recovered and incubated (27 ° C) along with extracts at increasing concentrations of 0.62%, 1.25%, 2.5%, 5%, 10% and a negative control group with distilled water. The reading was done in 48h in inverted microscope. All concentrations showed effects on hatchability. It was observed that *P. florida* was more effective than the other *Pleurotus*, inhibiting hatchability by up to 92.19% at the highest concentration (10%), with LC50 of 2.13% ( $\pm$  0.12), while inhibition *P. ostreatus* was 55.46%, coLC50 7.44% ( $\pm$  0.09), while *P. djamor* 23.67% at the same concentration. The use of this fungus against cyathostomines shows great potential as a biological control of the nematode.

**Keywords:** Horses, cyathostomes, *Pleurotus* spp, biologic control



## LISTA DE TABELAS

<b>Table 1.</b> Lethal concentration of <i>Pleurotus. ostreatus</i> , <i>P. florida</i> and <i>P. djamor</i> on hatchability of cyathostomines larvae.....	35
--	----

## LISTA DE FIGURAS

- Figure 1.** Activity of *Pleurotus florida* (A), *P. ostreatus* (B) e *P. djamor* (C) on inhibition of hatchability of cyathostomins larvae.). Asterisk in columns indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).....36
- Figure 2.** Total amount of proteins of *P. ostreatus*, *P. florida* and *P. djamor*. Asterisk in columns indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).....37
- Figure 3.** Gas chromatography coupled with mass spectrometry of volatile organic compounds of *P. ostreatus* extract. Tridecanoic acid (1), tetradecanoic acid (2), linolelaidic acid (3), 9,15 octadecadienic acid (4), oxalic acid (5) .....37
- Figure 4 a.** Gas chromatography coupled with mass spectrometry of volatile organic compounds from *P. djamor* aqueous extract. Tridecanoic acid (1), linolelaidic acid (2).....38
- Figure 4 b.** Gas chromatography coupled with mass spectrometry of volatile organic compounds from *P. djamor* aqueous extract. Undecanoic acid (3).....39
- Figure 4 c.** Gas chromatography coupled with mass spectrometry of volatile organic compounds from *P. djamor* aqueous extract. Tetradecanoic acid (4).....39
- Figure 4 d.** Gas chromatography coupled with mass spectrometry of volatile organic compounds from *P. djamor* aqueous extract. Oxalic acid (5).....39

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
2.1	Nematoides gastrointestinais .....	14
2.1.1	<b>Família Strongylidae .....</b>	<b>14</b>
2.2	Resistência Antihelmíntica .....	16
2.3	Métodos de controle alternativo.....	17
2.4	Controle biológico .....	18
2.5	<i>Pleurotus</i> spp. ....	20
<b>3</b>	<b>MANUSCRITO .....</b>	<b>22</b>
3.1	ARTIGO .....	22
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>40</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Possuindo o terceiro maior rebanho equino do mundo, o Brasil dispõe de mais de 5 milhões de cabeças, sendo que, o Rio Grande do Sul conta com 553.191 equinos registrados (IBGE, 2016). Calcula-se que a equinocultura brasileira gire em torno de aproximadamente R\$ 7,5 bilhões por ano gerando diversos empregos diretos (BRASIL, 2006). O cuidado com o bem-estar desses animais deve ser prioridade, pois apresentam grande importância na agricultura e pecuária visto que são utilizados diariamente para o manejo das propriedades rurais, competições e leilões, gerando expressivo crescimento no país (ANUALPEC, 2012).

No Brasil, a forma de criação de equídeos é preocupante, uma vez que favorece as infecções parasitárias que causam alta morbidade e mortalidade durante toda a vida do animal. Os equinos são acometidos por uma variedade de helmintos gastrointestinais, onde destacam-se os pequenos e grandes estrôngilos, que dependendo da carga parasitária, podem ocasionar baixo desempenho, cólica e diarreia, podendo levar o animal a óbito. Também são relatadas alterações nos parâmetros sanguíneos como anemia, eosinofilia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia (MADEIRA DE CARVALHO, 2006; LAGAGGIO et al., 2007; DIAS et al., 2014).

O controle desta enfermidade é realizado através do manejo adequado e o uso de antihelmínticos de três classes medicamentosas: Benzimidazóis, tetra- hidropirimidinas e lactonas macrocíclicas que são capazes de reduzir a carga parasitária dos animais e eliminar os ovos presentes nas fezes, evitando assim a contaminação ambiental. Entretanto, o uso indiscriminado de antiparasitários leva a quadros de resistência parasitária, intoxicação por doses inadequadas, resíduo de antihelmínticos na carne, assim como a contaminação ambiental e por esses motivos é preciso pensar em novas formas de tratamento (MOLENTO, 2005; MADEIRA DE CARVALHO, 2006; TRAVERSA et al., 2009).

O controle biológico com fungos nematófagos é amplamente discutido quando se trata de ovos e larvas de nematoides gastrointestinais, dado que, esses agentes expressam vínculo predatório ou parasítico com nematoides, classificando-se em: ovicidas, endoparasitas, predadores e produtores de toxinas (GRAMINHA et al., 2005). O fungo

do gênero *Pleurotus* é um cogumelo comestível com ampla distribuição mundial. Apresenta ação nematófaga através da produção e liberação de toxinas como a toxina ácido trans-2-decenodioico. Por essa razão é importante ser estudado como alternativas no controle de helmintos gastrointestinais de equinos, como os ciatostomíneos (KWOK et al.,1992; CHEN, DICKSON e MITCHELL, 2004).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Nematoides gastrointestinais

Pertencente ao filo Nematoda e classe Secernentea, os nematoides em sua maioria possuem vida livre no ambiente. Porém algumas espécies são parasitos de plantas e animais, sendo 16 superfamílias de importância veterinária. Os helmintos gastrointestinais possuem simetria bilateral, corpo cilíndrico revestido por uma cutícula externa, sistema digestivo completo, contendo boca, vestíbulo digestivo oral, lábios, esôfago, faringe, intestino, ânus, e sistema genital. Variam de tamanho, sendo que algumas espécies atingem apenas alguns milímetros, enquanto outras podem chegar a vários metros (MONTEIRO, 2017; TAYLOR, COOP e WALL, 2017).

Observa-se duas fases no ciclo de vida dos nematódeos, uma fase exógena onde os ovos são eliminados nas fezes e os estágios larvais passam a se desenvolver (Larva de estágio 1- L1 e Larva de estágio 2- L2) no interior do bolo fecal onde se alimentam de matéria orgânica e alguns microrganismos e outra endógena, onde os parasitos gastrointestinais necessitam do hospedeiro para prosseguir o seu desenvolvimento. A fase endógena começa quando há ingestão via oral de larvas de estágio 3 (L3) que até então ficavam no interior dos ovos, ou livres no solo. Após a ingestão, o desenvolvimento de L3 a adulto ocorre no sistema digestório, onde, a larva infectante transforma-se em larva de estágio 4 (L4), posteriormente em larva de estágio 5 (L5), até atingir o estágio adulto. Algumas se desenvolvem no interior da mucosa intestinal, de onde saem apenas quando atingem a maturidade. (URQUHART et al., 1996; SILVA, 2014; MONTEIRO, 2017).

Os parasitos adultos são capazes de se fixar na mucosa tanto gástrica como intestinal e causar diferentes patologias tanto mecânica como traumática levando a presença de sinais clínicos no hospedeiro. Outras espécies podem migrar pela circulação e desenvolver-se em diversos órgãos do hospedeiro. Após encontrar o seu local preferencial, as L3 tornam-se adultas, diferenciam-se em machos e fêmeas, copulam, e após a fertilização, inicia-se a postura de ovos e/ou larvas completando o ciclo (COSTA et al., 2011; MONTEIRO, 2017).

#### 2.1.1 Família Strongylidae

A família Strongylidae é caracterizada principalmente por dispor de cápsula bucal e um esôfago claviforme. Divide-se em duas subfamílias Strongylinae e Ciathostominae, respectivamente chamados de grandes e pequenos estrongilídeos devido as suas características morfológicas de tamanho de corpo e cápsula bucal. Os grandes estrôngilos pertencem ao gênero *Strongylus* (*S. equinus*, *S. edentatus*, *S. vulgaris*). *Strongylus vulgaris* é relatado como a espécie mais patogênica para equinos (BASSAN et al., 2008) devido as lesões causadas na artéria mesentérica e seus ramos, desenvolvendo tromboembolias e endoarterites fazendo com que os animais apresentem sinais clínicos de cólicas anemia, apatias, febre inapetência (NASCIMENTO et al., 2008; MONTEIRO, 2017).

Os pequenos estrôngilos são os mais frequentes em fezes de equinos e em coproculturas, representando de 80% até 100% das larvas encontradas em terceiro estágio (SARTORI FILHO et al., 1993). Compõe um grupo de 51 espécies já descritas parasitando equídeos, como por exemplo: *Coronocyclus* spp., *Craterostomum* spp., *Cyathostomum* spp., *Cylicocyclus* spp., *Cylicodontophorus* spp., *Cylicostephanus* spp., *Paraposteriostomum* spp., *Petrovinema* spp., *Poteriostomum* spp. e *Triodontophorus* spp. (BOWMAN, 2006; LICHTENFELS, KHARCHENKO e DVOJNOS, 2008). São nematódeos com até 12 mm de comprimento, de coloração avermelhada que apresentam uma pequena cápsula bucal sem dentes e formato cilíndrico. São visivelmente encontrados na inspeção da mucosa do intestino grosso ou no bolo fecal em infecções severas (LICHTENFELS et al., 2008). Seu ciclo é direto e sem migrações pelo organismo. Os ovos são eliminados juntamente com as fezes, desenvolvem-se no meio ambiente, passam por dois estádios larvais (L1 e L2) até chegar à forma infectante (L3) para equinos. Após ingestão de L3 por via oral simultaneamente com a pastagem as larvas chegam e penetram nas criptas de Lieberkuhn do ceco e cólon, localizando-se na região da mucosa e submucosa, logo, mudam para outro estágio larval, L4 que durante seu desenvolvimento são envolvidas por fibroblastos gerando cistos fibrosos. Em seguida ocorre a migração da L4 para o lúmen do intestino grosso, mudando seu estágio para L5 e conseqüentemente dando origem aos parasitos adultos (CORNING, 2009; REINEMEYER E NIELSEN, 2013).

Como os pequenos estrôngilos podem estar em hipobiose, o período pré-patente varia muito, podendo ser de 6 semanas até dois anos, uma vez que, essa inibição temporária do desenvolvimento têm um importante papel na patogenia da doença pois as

larvas encistadas ficam protegidas do sistema imune e da ação da maioria dos antihelmínticos. As larvas voltam a evoluir quando as condições externas se tornam favoráveis (LYONS et al., 2000; CORNING, 2009; MARTINS et al, 2019). Infecções por ciatostomíneos geralmente são bem toleradas pelo hospedeiro, porém, podem causar enterite. Quando há a penetração da L3 na mucosa intestinal, grande quantidade de larvas encistadas podem desenvolver sinais clínicos no equino como: diarreia, pirexia, taquicardia, taquipneia e emagrecimento progressivo (LOVE et al., 1999; PIEREZAN et al., 2009).

Quando acontece a maturação de várias larvas encistadas ocorre um fenômeno chamado Ciatostominose tipo II ou Ciatostominose larval promovendo, acentuada perda de peso, diarreia grave, desidratação, fraqueza, edema subcutâneo e cólica (LOVE et al., 1999; LYONS et al., 2000), os achados laboratoriais coincidem com hipoproteïnemia, hipoalbuminemia, microcitose, elevação dos níveis de fibrinogênio (PEREGRINE et al., 2006). A Ciatostominose larval é comumente diagnosticada no final do inverno ou início da primavera em animais com três anos de idade, contudo a doença clínica pode acontecer em equinos de qualquer idade e em qualquer estação do ano e permanecer por toda a vida do animal (LOVE et al., 1999). Para controle é importante tratar os equinos no inverno com antihelmínticos eficazes contra a enfermidade, diminuindo assim infecções adquiridas na primavera. É importante avaliar a eficácia dos produtos, comparando a quantidade de ovos nas fezes pré e pós tratamento, visto que a resistência antihelmíntica já é relatada (MONTEIRO, 2017).

## 2.2 Resistência Antihelmíntica

A resistência parasitária é um fenômeno onde o fármaco indicado para o tratamento não consegue manter a eficácia contra os parasitos após um determinado tempo, ou seja, algumas populações de parasitos possuem genes que codificam para resistência contra determinado fármaco. Considera-se resistente quando qualquer droga que produzia diminuição da carga parasitária acima de 95% decresce em eficácia contra o mesmo organismo em determinado tempo. A taxa de evolução da resistência é definida pela pressão de seleção e a progressão da resistência sucede quando estes indivíduos sobrevivem aos tratamentos e passam seus genes para as gerações seguintes (CONDER, CAMPBELL, 1995; MOLENTO, 2005).



Em uma população geneticamente heterogênea quando ocorre a seleção de parasitos resistentes o fármaco utilizado remove parasitos susceptíveis, fazendo com que aumente o número de portadores dos genes resistentes e ocorra a transmissão para os seus descendentes. Depois de várias gerações, os genes resistentes acabam predominando e possibilitando a sobrevivência dos helmintos logo após o tratamento com antihelmínticos (KÖHLER, 2001). Para reversão da resistência, diminuir a frequência de indivíduos resistentes e conseqüentemente a remoção do agente de seleção seria uma necessidade, entretanto, essa reversão não foi observada (SANGSTER, DOBSON, 2002).

No final dos anos 50 e início dos 60 foram descritos os primeiros relatos de resistência antihelmíntica para a droga fenotiazina em *Haemonchus contortus* (DRUDGE, 1957) e posteriormente em ciatostomíneos em equinos (DRUDGE E ELAM, 1961). O uso indiscriminado de tiabendazol e benzimidazóis marcou o início da agressão química sobre helmintos e em poucos anos a resistência em *H. contortus* foi constatada e logo após em ciatostomíneos (CONWAY, 1964; DRUDGE, LYONS, 1965). Em cavalos norte-americanos, os ciatostomíneos desenvolveram resistência ao benzimidazóis, às pirimidinas e à piperazina (DOBROWOLSK et al., 2016). Atualmente, diversos estudos já demonstraram a redução da eficácia dos benzimidazóis, pamoato de pirantel e até mesmo das lactonas macrocíclicas (MARTINS et al., 2019).

A ivermectina em equinos é utilizada há três décadas para o controle de helmintos, porém, somente nos últimos anos foi descrita a resistência dos parasitos contra esse fármaco. Sugere-se que isso ocorra devido a incapacidade de atuação do fármaco em larvas de quarto estágio encistadas na mucosa intestinal, consideradas uma grande população de refugia. Em pequenos estrôngilos a moxidectina ainda possui atividade antihelmíntica, todavia foi descrito a redução da eficácia e possível resistência (KAPLAN, 2002; MOLENTO et al., 2008; TRAVERSA et al., 2009).

### 2.3 Métodos de controle alternativo

O uso indiscriminado de fármacos resultou em parasitos resistentes, fazendo com que muitos medicamentos antihelmínticos perdessem seu efeito. Devido a isso, métodos de tratamento alternativos estão sendo empregados como recurso terapêutico para enfermidades gastrointestinais em equinos (VIEIRA 2007; VIEIRA 2003). Um método alternativo utilizado principalmente em pequenos ruminantes é a homeopatia, descrita como vantajosa por alguns autores devido à ausência de resíduos medicamentosos que

trazem vantagens financeiras para saúde dos criadores e consumidores (MORALES, 2004). Segundo Barbosa, Budel e Manfron (2010), em 1796, Hahnemann foi o precursor do uso de homeopatia em equinos obtendo sucesso no tratamento de uma infecção ocular com o medicamento chamado *Natrum muriaticum*. Anos após em 1829 e 1833, Bruchner e Guillaume utilizaram a homeopatia para a cura de cólicas em equinos. Benez et al. (2004) indicam a homeopatia para equinos a base de *Aconitum napelus*, *Cina*, *China* e *Arsenicum album*.

O uso de fitoterápicos tem sido foco de diversos estudos a fim de controlar diversas patologias. A utilização de produtos naturais como plantas, extratos vegetais, sementes e diversos outros fitoterápicos tem sido testada cientificamente contra nematódeos gastrointestinais (CEZAR; CATTO; BIANCHIN, 2008). O nim (*Azadirachta indica*, *A. juss*), uma planta originária da Índia, apresenta atividade contra insetos, nematoides, fungos e bactérias. Para validação do efeito fitoterápico de uma planta devem ser feitos testes *in vitro* e *in vivo* (DIAS et al., 2014).

Uma pastagem livre de contaminação traz inúmeros benefícios para a saúde animal, pois ao mover animais susceptíveis (jovens) para pastagens limpas e descontaminadas a chance de infecções por nematodas gastrointestinais é menor. Porém, o desenvolvimento da sua resposta imunológica também pode ser afetado por falta de contato com parasitos (WALLER, 2002; AMARANTE, 2004). O pastejo rotacionado é um método utilizado principalmente para redução da carga parasitária, onde é feita a divisão da pastagem em piquetes e uma elevada densidade de animais é alojada em um dos piquetes por um curto período de tempo. Posteriormente é feita a retirada dos animais para outro piquete a fim de recuperar a pastagem até que esteja novamente ideal para uso e assim sucessivamente até os animais passarem por todos os piquetes. Além de um melhor aproveitamento nutricional para o animal, o pastejo rotacionado proporciona uma ação antiparasitária, devido o tempo de permanência do animal no piquete ser menor que o tempo de desenvolvimento larval e conseqüentemente ocorre a destruição e inviabilidade das larvas parasitas (CEZAR; CATTO; BIANCHIN, 2008).

## 2.4 Controle biológico

Usa-se o termo controle biológico para expressar a utilização de microrganismos naturais capazes de reduzir parcialmente ou totalmente populações de outros organismos na natureza (GRONVOLD et al., 1996; AGRIOS, 2004). Por utilizar patógenos próprios

da natureza, o controle biológico não causa distúrbios ambientais, é de fácil aplicação, apresenta um custo relativamente baixo, não favorece a seleção de populações resistentes e evita a resistência parasitária (MACHADO; KANEKO; PINTO, 2016).

O emprego de microrganismos com ação sobre ovos e larvas de nematoides, faz com que ocorra uma limpeza nas pastagens diminuindo assim a infecção de hospedeiros. Mais de 200 espécies de organismos, dentre eles fungos, bactérias, nematoides predadores e ácaros são considerados capazes de predação ou parasitar nematoides. Os fungos nematófagos são os principais agentes biológicos estudados para tal objetivo (SOARES, 2006; GIROTTO et al., 2008).

Os fungos nematófagos são classificados de acordo com seu mecanismo de ação, podendo ser predadores, endoparasitas, ovicidas e produtores de metabólitos tóxicos (MACHADO; KANEKO; PINTO, 2016). Cerca de 70 gêneros e 160 espécies de fungos nematófagos são relatados com capacidade de se alimentar de nematoides (FERRAZ et al., 2001). Possuem habilidade de capturar, parasitar ou paralisar nematoides em qualquer estágio do seu ciclo (GRAY, 1988). Fungos predadores, apresentam capacidade saprofítica além do crescimento *in vitro* ser de forma fácil e simples. Os principais gêneros desse grupo de fungos são *Monacrosporium* e *Arthrobotrys*, os quais formam armadilhas ao longo de suas hifas e assim capturam nematoides móveis presentes no solo. As armadilhas diferem entre espécies de fungos, podendo formar redes adesivas, ramos adesivos, nódulos adesivos ou anéis constritores (MANKAU, 1980; AHREN E TUNLID, 2003).

Fungos endoparasitas diferentes dos predadores, não formam armadilhas e sim infectam nematoides por meio dos seus esporos (conídios ou zoósporos). Essa infecção ocorre através da ingestão dos esporos ou a aderência dos mesmos na cutícula do parasito. Em contato com o nematoide, o esporo germina e se difunde pelo corpo absorvendo o conteúdo interno do helminto, logo após os tubos de liberação de esporos são formados (MOTA et al., 2003). Os fungos produtores de zoósporos, se aderem ao corpo do nematoide e encistam-se e então penetram por aberturas naturais, assim é o início do seu crescimento (JANSSON et al., 1997). Seu uso no controle biológico é limitado, pois os zoósporos dependem da quantidade de água presente no solo (MACHADO; KANEKO; PINTO, 2016).

Os fungos ovívidos ou oportunistas são capazes de consumir todo o conteúdo dos ovos. A penetração das hifas ocorre pelo meio de poros presentes na camada vitelínica, fazendo com que altere a permeabilidade da casca e aumente o volume. Ao passar pela camada vitelínica a hifa aumenta e ultrapassa a camada quitínica e lipídica. Por conta disso, ocorre a divisão das camadas, sendo que, a camada quitínica torna-se vacuolizada e a camada lipídica dispersa. Sendo assim, hifas endógenas surgem do ovo e produzem conidióforos (fonte de conídios) (ARAÚJO et al., 2004; GIROTTO et al., 2008).

Finalmente, os fungos produtores de metabólitos tóxicos que são conhecidos por produzirem toxinas capazes de imobilizar e/ou eliminar nematoides, afetando principalmente a motilidade, capacidade de eclosão dos ovos e a penetração no hospedeiro, até a morte desses parasitos (KERRY et al., 1984). Os principais gêneros estudados são *Aspergillus*, *Pleurotus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Myrothecium* (MACHADO; KANEKO; PINTO, 2016). O gênero *Trichoderma* é estudado no controle de nematoides, pois é capaz de degradar a quitina, atuando assim, nos ovos dos nematoides (SHARON et al., 2001; SUAREZ et al., 2004).

## 2.5 *Pleurotus* spp.

*Pleurotus* spp. também chamados de cogumelo “ostra” devido ao seu formato, possui um corpo frutífero com píleo e estipe bem definidos. Pertence a filo Basidiomycota, classe Basidiomycetes, subclasse Holobasidiomycetidae, ordem Agaricales e família Pleurotaceae, possui alto valor nutricional e diversas propriedades terapêuticas (OLIVEIRA et al; 2007). Mundialmente já foram descritas mais de 1000 espécies de fungos do gênero *Pleurotus*, também conhecido popularmente como Shimeji, entretanto, apenas 50 destas são reconhecidas para este gênero. Espécies são extensamente distribuídas com uma ampla variedade de cores, como por exemplo: marrom (*P. ostreatus*), amarelo (*P. citrinopileatus*), salmão (*P. djamor*), e branco (*P. florida*) (GUZMAN, 2000; WARTCHOW, PUTZKE, CAVALCANTI, 2008).

Esse gênero de cogumelo aponta grande eficácia na degradação de vários componentes insolúveis de material lignocelulolíticos, mostrando-se importante na bioconservação de suplementos alimentares. Produzem compostos bioativos os quais são aplicados na medicina, como polissacarídeos, lipídios e proteínas além da produção de enzimas extracelulares (proteases, quitinase e collagenases) envolvidas na destruição da

cutícula de nematoides para futura infecção (HUANG, ZHAO, ZHANG, 2004; LA GUARDIA et al., 2005; YASHVANT et al., 2012) .

*Pleurotus* fresco apresenta em torno de 85-90% de umidade, são vistos como uma boa fonte de proteína, chegando até 42g de proteína por 100g de cogumelo seco. Exibe adequada distribuição de aminoácidos essenciais e não essenciais, entretanto, o teor varia conforme a estrutura genética da espécie, além de diferenças físicas e químicas relacionadas ao meio de cultivo, composição do substrato e tempo de colheita. Apontam baixo teor de gordura, considerados fonte relevante de ácidos graxos essenciais para atender necessidades do corpo humano (OYETAYO, AKINDAHUNSI, OYETAYO, 2007; ALAM et al., 2008). O principal ácido graxo monoinsaturado é o ácido oleico enquanto que o ácido linoleico é o principal polinsaturado. Já o *P. ostreatus* possui o ácido linoleico e palmítico em maior quantidade, e o *P. florida* apresenta o ácido oleico como predominante. (KHAN E TANIA, 2012).

Por séculos os cogumelos foram utilizados por apresentar propriedades medicinais na China, Japão e Coreia, porém seu uso na saúde foi registrado 100 d.C. na China (GUNDE-CHIMERMAN, 1999) e até os dias de hoje vêm sendo comercializado na forma de extratos, pós do corpo frutífero ou micélio. Sua atividade antitumoral, anti-hipertensiva, hepatoprotetora, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antiviral e antiparasitária já foi relatada (SARANGI et al., 2006; KHAN E TANIA, 2012; PINEDA-ALEGRÍA et al., 2017).

### 3 MANUSCRITO

#### 3.1 ARTIGO

Artigo submetido a revista “*Journal of helminthology*”

*In vitro* activity of aqueous extract of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida* e *Pleurotus djamor* on cyathostomins eggs

Marjorie Giacometi<sup>1\*</sup>; Lucas Trevisan Gressler<sup>2</sup>; Letícia Petry dos Santos<sup>1</sup>;  
Antônio Francisco Igor Magalhães de Matos<sup>1</sup>; Talissa Silva dos Santos<sup>1</sup>; Janaína  
Brand Dillmann<sup>1</sup>; Eduarda Maria Santi<sup>1</sup>; Silvia Gonzalez Monteiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia e Parasitologia - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade de Cruz Alta, RS, Brasil.

#### Abstract

Cyathostomins are nematodes commonly found in horses that can cause significant losses in animal health. Indiscriminate use of anthelmintic can result in the selection of resistant parasite populations, making it difficult to control, thus affecting animal health and welfare. Alternative control methods become essential for sustainable parasite control, reducing the use of drugs that may be harmful to the environment and animals. The *Pleurotus* spp. is an edible mushroom that has several therapeutic properties, including antiparasitic activity. Therefore, the objective of this study was to evaluate the *in vitro* activity of three species of *Pleurotus* spp. on cyathostomins eggs. Firstly, three species of mushrooms were produced, *Pleurotus florida*, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus djamor*. Then, they were dehydrated and crushed to develop an aqueous extract. Subsequently, cyathostomins eggs were recovered from fecal samples and placed in cellular culture plates to test different concentrations of the mushroom extracts. Among the mushroom species analyzed, all concentrations expressed a certain effect, *P. florida* showed the highest efficacy, inhibiting the hatchability of approximately 92% of the larvae of the highest concentration (10%) with an LC<sub>50</sub> of 2.13% ( $\pm$  0.12). *P. ostreatus* inhibited hatchability by 55.46% with LC<sub>50</sub> of 7.44% ( $\pm$ 0.09) at the same concentration. Whereas *P. djamor* presented the lowest efficacy, with approximately 23% of hatchability inhibition at the highest concentration. Thus, our results allow us to conclude that *P. florida* can be considered as a possible alternative in the biological control of equine cyathostomins.

**Keywords:** Strongylida, mushrooms, horses, biologic control

## Introduction

Gastrointestinal nematoids are commonly found in equine herds and cause economic losses to the animal due to decreased development, diarrhea and anemia that can lead to death, in addition to expenses with medication and health management (Araújo et al., 2006). Cyathostomins are helminths pertaining to the subfamily Cyathostominae, hematophages, of high prevalence in horses and with a wide diversity of genera, with over 50 species already reported (Anjos & Rodrigues, 2006; Couto et al., 2009). They are capable of developing both in the lumen and in the mucosa of the large intestine and present variable pathogenicity, with horses manifesting low performance and weight loss, decreased growth, chronic diarrhea as well as subcutaneous edema and colic. The larvae at stage L4 can cause a serious illness mainly in horses from one to three years old, because these immature stages are located in the wall of the large intestine producing nodules that can lead the animal to death (Pereira & Vianna, 2008; Peregrine et al., 2014).

Anthelmintics have been administered to horses for over 50 years and yet their indiscriminate use (Tzelos et al., 2019) has culminated in the selection of populations of resistant parasites, thus making the ineffectiveness of antiparasitic agents a growing problem affecting animal health and welfare (Molento et al., 2008; Traversa et al., 2009). In general, the parasite control of equines is made from three drug classes, benzimidazoles, tetrahydropyrimidines and macrocyclic lactones (Molento & Canever, 2018). Strongylides are proven to be resistant to benzimidazoles and tetrahydropyrimidines (Kaplan, 2002 a, 2004 b). Recently, macrocyclic lactones were considered to be effective in controlling cyathostomins and so far there were no significant signs of resistance (Kaplan & Vidyashankar, 2012). Of this last group, ivermectin resistance cases have been described in different countries such as Finland, Italy, UK and Brazil (Peregrine et al., 2014) while there are reports of low levels of resistance for moxidectin in the US and Brazil, with short-term egg reappearances after treatment (Molento et al., 2008; Rossano et al., 2010; Lyons et al., 2011). For this reason, we see the need to establish new control methods in order to reduce the use of chemicals and consequently delay the emergence of resistant populations.

The use of biological control refers to the use of existing natural antagonistic microorganisms in the environment in organisms considered pests (Gronvold et al., 1996). Biological control methods are considered less harmful to the environment when

compared to the use of chemicals (Mota et al., 2003). The biological control with nematophagous fungi is already employed in veterinary medicine and presents positive results in the control of gastrointestinal parasitosis of horses (Braga et al., 2013).

Mushrooms are used as a medicine and in food because of their medicinal properties and high nutritional content (Badarina et al., 2017). *Pleurotus* spp. has a wide worldwide distribution, with 50 valid species already described, among them *P. ostreatus*, *P. djamor* and *P. florida* (Wartchow et al., 2008; Guzman, 2000). The genus *Pleurotus* has several organic acids, polysaccharides, proteins, vitamins and minerals with outstanding antioxidant, immunomodulatory, anti-inflammatory, antimicrobial and antitumor activities (Heydari et al., 2006). Some studies prove its antiparasitic action against protozoa and helminths, such as *Ascaridia galli*, *Panagrellus* sp. and *Haemonchus contortus* (Ganeshpurkar et al., 2012; Genier et al., 2015; Alexandre et al., 2017; Badarina et al., 2017; Pineda-Alegría et al., 2017; Ramezani et al., 2017; Cuevas-Padilla et al., 2018).

Pineda-Alegría et al. (2017) in their study against *Haemonchus contortus*, which is also a Strongylida proposes that the ovicidal action of *Pleurotus* is due to the presence of fatty acids, mainly pentadecanoic, hexadecanoic, octadecadienoic and octadecanoic acid, as well as a terpene, b-sitosterol. Kwok et al. (1992) have purified a toxin, trans-2-decenodioic acid from *P. ostreatus* which has demonstrated effect against helminths of the genus *Panagrellus*. Satou et al. (2008), when investigating the predatory activity of *P. ostreatus*, concluded that the mushroom causes the nematoid head to shrink in size, associating it with linoleic acid peroxide or other unsaturated fatty acids derived from the breakdown of hyphae sprouts. However, research about the biological activity of *Pleurotus* sp. on helminths of veterinary importance is still incipient. Therefore, the objective of this work was to evaluate *in vitro* the activity of *P. ostreatus*, *P. djamor* and *P. florida* on cyatostomine eggs.

## **Material and Methods**

### *Obtention of Pleurotus spp.*

In order to obtain the fruit, the different species of mushrooms were acquired commercially. The fragments of the interior of the cap (4 mm diameter) were sown in Potato Dextrose Agar (PDA) (Sigma-Aldrich) and placed in sealed glass with polyvinyl chloride (PVC) film, for 10 days, in a dark place and at room temperature 24°C ( $\pm$  1)



(Lopes et al., 2015). After colonization of the PDA by mycelium, small pieces of  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  were removed from the medium for introduction into polyethylene bags with moistened and autoclaved maize grains. The bags containing the grains and mycelium remained for 20 days in the dark at room temperature ( $24^\circ\text{C} \pm 1$ ) until they were completely myceliated. These myceliated grains were transferred to previously autoclaved haystraw (Tifton) bags, left in the dark at a temperature of  $24^\circ\text{C}$  until the beginning of fruiting. The harvested mushrooms were dehydrated at  $50^\circ\text{C}$  for 24 hours for drying.

#### *Obtention of aqueous extract*

After dehydration, the mushrooms were ground together with distilled water in the ratio 1:25 (1 g mushroom to 25 ml distilled water). Soon after, the obtained liquid was placed in a water bath for 60 minutes under constant agitation at a temperature of  $40^\circ\text{C}$  (Nery et al., 2010). Then, the content was filtered in an infundibulum with open weft cotton cloth and then frozen in a freezer at  $20^\circ\text{C}$ .

#### *Obtention of Cyathostomins eggs*

The eggs of cyathostomins were recovered from the faeces of a naturally infected equine (*Equus caballus*). The number of eggs per gram of faeces (faecal egg count, FEC) was estimated by Gordon & Whitlock's technique (1939), followed by coproculture (Roberts & O'Sullivan, 1950) and larval identification according to Bevilaqua et al. (1993).

The recovery of eggs was performed according to the methodology described by Bizimenyera et al. (2006). Faeces from an equine were collected directly from the rectal ampoule, macerated in distilled water at  $37^\circ\text{C}$  and filtered in a sequence of four sieves of different reticulations (1 mm,  $73 \mu\text{m}$ ,  $43 \mu\text{m}$  and  $25 \mu\text{m}$ ). The eggs retained in the last sieve ( $25 \mu\text{m}$ ) were recovered and added in falcon tubes (15 ml) with saturated salt solution (3:10) and then centrifuged at 3000 rpm for 5 min until a clear solution composed only of eggs was obtained.

#### *Hatchability test*

This *in vitro* test, which evaluates the ovicidal activity of the tested solutions, was based on the method described by Coles et al. (1992) and standardized by Von Samson-Himmelstjerna et al. (2009). After recovery, the eggs were incubated with the aqueous

extract of the three species of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus*, *P. djamor*, *P. florida*). The experiment was composed of five groups per extract, composed of increasing concentrations of 0.62%, 1.25%, 2.5%, 5% and 10%, based on the study of Cuevas-Padilla et al. (2018), and a negative control group with distilled water. Approximately 155 eggs of cyathotomins were added in a 24-well culture plate together with the different treatments, making a final volume of 1ml/well. The test was performed in triplicate. The plates were incubated at 27°C and 80% humidity in a Biochemical Oxygen Demand (BOD) incubator. After 48 hours a drop of lugol solution was added in order to block the test. The total number of eggs and larvae in each well was counted under an inverted optical microscope to assess the percentage of larval hatchability. The test was validated when the negative control had an hatch greater than 90%. To calculate the percentage of inhibition of larval hatchability (Coles et al., 2006), the formula (%) inhibition = [(A-B) / A ] X 100 was used, where A = number of larvae hatching in the negative control and B = number of hatchings in the test solutions.

#### *Total protein quantification (aqueous extract)*

The technique used for total protein quantification was Coomassie blue (Bradford, 1976) where the standard curve was prepared from bovine albumin solution in five different concentrations of 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 and 1 mg.mL<sup>-1</sup> in duplicate. The test was performed in 96-well microplates and read in 562 nm wavelength spectrophotometer.

#### *Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) (aqueous extract)*

The chromatographic assays were performed in GC-MS utilizing Rtx-5MS column of 30 m x 0.25 mmID and 0.25 micrometers. The temperature ramp ranged from 50 to 280 °C with total analysis time of 80.7 min and flow rate of 13.7 mL/min. The injection was performed in splitless mode with a temperature of 240°C. The ionization source EI (70 ev) at 250 °C was used. The mass spectrometer operated in full-scan mode in the range of 35 to 600 m/z.

#### *Statistical analysis*

All data obtained were previously analyzed for normality and homogeneity with the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. While the results obtained in the larval hatch test were analyzed by linear regression to obtain the mean lethal concentration (LC50), which represents the concentration required to cause 50% mortality in the

population studied. Then, all variables were evaluated through analysis of variance (ANOVA) with a 95% confidence level and the differences between groups were evaluated in Post-Hoc analysis with the Tukey test ( $p < 0.05$ ). The results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation of the mean.

## Results

### *Hatchability test*

Among the mushroom species evaluated, *P. florida* and *P. ostreatus* were more effective compared to *P. djamor*. In the 10% concentration, *P. florida* and *P. ostreatus* inhibited the hatchability of larvae by 92.19% and 55.46% respectively (fig.1). It was observed that the lethal concentration  $LC_{50}$  (%;p.v) was  $2.12 \pm 0.12$  for *P. florida* and  $7.44 \pm 0.09$  for *P. ostreatus* (table.1), while *P. djamor* had the lowest effect on hatchability, with 23.67% inhibition of larvae (fig.1).

### *Total protein quantification (aqueous extract)*

The protein concentration of *P. ostreatus* was higher than the other two species evaluated, with 1.12 mg/mL of total protein, while *P. florida* and *P. djamor* presented 0.53 and 0.57 mg/mL, respectively (fig.2).

### *Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) (aqueous extract)*

In the evaluation of the aqueous extract of *P. ostreatus* the presence of different acids such as linolelaidic acid, oxalic acid, tridecanoic acid, 9,15 octadecadienic acid and tetradecanoic acid was observed. Linolelaidic acid, oxalic acid, tridecanoic acid, undecanoic acid and tetradecanoic acid were identified in the aqueous extract of *P. djamor*. In the aqueous extract of *P. florida* no volatile organic compounds were detected.

## Discussion

Edible mushrooms with medicinal properties predominantly cultivated around the world belong to the genera *Agaricus* spp., *Lentinula* spp. and *Pleurotus* spp. (Taofiq et al., 2016). Numerous bioactive compounds are reported in their extracts, among them more than 200 compounds with nematicidal activity (Pineda-Alegría et al., 2017; Cuevas-Padilla et al., 2018). In particular, *Pleurotus* attracts the attention of researchers for presenting a possible mechanism against parasites of agricultural and livestock

importance. However, data on the activities of different species against animal helminth parasites are incipient (Taofiq et al., 2016).

In this study the mushroom species were dehydrated at 50°C for 24 hours. According to Martínez-Soto et al., (2001) and Kurozawa et al., (2012), the dehydration method is efficient to prevent mushroom degradation, since it is composed of 90% water and its removal reduces enzymatic, chemical and microbiological reactions, increasing the life of the extract. Furthermore, Wolff et al. (2008) using the same dehydration methodology with *P. ostreatus*, obtained an inhibitory activity of bacteria such as *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, as well as a 60.5% reduction in growth of *Candida albicans*, concluding that the dehydration process is effective and does not interfere with the biological action of the mushroom.

In our study, the aqueous extract of *P. ostreatus* extract inhibited hatchability by 55.46% at the highest concentration (10%), while *P. florida* presented higher efficacy, with 92.19% inhibition of larvae hatchability at the same concentration. Corroborating with Wille et al. (2019), where they used the aqueous extract of different species of *Pleurotus* (*P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. citrinopileatus*, *P. sajor-caju*, *P. ostreatoroseus*) was evaluated against the nematoid of the gallows (*Meloidogyne incognita*) inhibiting hatchability by up to 98.40%, being *P. ostreatus* the species with the highest activity (Wille et al., 2019).. Based on these data it is believed that *P. florida* presents higher toxicity in nematode eggs than other mushroom species.

Cuevas-Padilla et al. (2018), evaluated different fractions of *P. djamor* hydroalcoholic extract in *Haemonchus contortus*, in the same concentrations of our study, however some fractions had low biological activity against nematoid. This is in line with our results, which despite being an aqueous extract, *P. djamor* showed low efficacy against cyatostominoan eggs. Sufiate et al. (2017), when using an extract of *P. eryngii* against *Meloidogyne javanica* eggs, observed a 53% reduction in the number of eggs, concluding that this occurred due to the proteolytic and chitinolytic action of the mushroom. According to the author, these enzymes caused ruptures in the eggshell besides the formation of vacuoles in them. We believe that the enzymatic action has also influenced the hatchability of cyatostomycin larvae in our study, since changes in egg shells were seen but not quantified, as well as the antioxidant activity of the mushroom, because according to Brugnari et al. (2016), aqueous extracts of *Pleurotus* spp. confer this action and produce phenolic compounds, which suppress the formation of free radicals.

In mushroom extracts, high levels of phenolic compounds consisting of aromatic rings with hydroxyl groups are observed, which promote the elimination of free radicals. The highest antioxidant activity depends on the number of hydroxyls (Im et al. 2014). The anthelmintic action of *Pleurotus* is related to the release of toxic drops derived from linoleic acid (Kwok et al., 1992; Hibbett and Thorn 1994; Satou et al. 2008). In this study we observed that *P. ostreatus* and *P. djamor* only differ in one acid, in which *P. ostreatus* presents 9,15 octadecadienoic acid and *P. djamor* the undecanoic acid. Unlike Pineda-Alegría et al. (2017), in our study *P. djamor* did not show ovicidal activity or the presence of the same bioactive compounds described by the author. According to Robledo et al. (2015), the antiparasitic activity is dependent on the composition of the substrate in which *P. djamor* was cultivated.

Stadle et al., (1994) described the nematicidal activity of *P. pulmonarius* tetradecanoic acid against a bacteriophage of *Caenorhabditis elegans* nematoid, and obtained immobility of the parasites at a LC<sub>50</sub> of 5 µg/ml. Linolelaidic acid is a transomer of linoleic acid (Phoon et al., 2001) and was detected in the present experiment in larger amounts in the extract of *P. ostreatus*. Although there are no reports of nematicidal activity from this acid, we observed the presence of tetradecanoic acid and linolelaidic acid in extracts of *P. ostreatus* and *P. djamor*, which should be the target of further studies to verify if they help inhibiting hatchability. Kwok et al. (1992), Anke & Sterner (1997) and Satou et al. (2008) related the nematicidal activity of *P. ostreatus* with octadienoic acid, and perhaps this fatty acid has a superior effect in preventing hatchability of the larvae, thus explaining the best activity of *P. ostreatus* in contrast to *P. djamor* in our study. Oxalic acid is an organic acid present in several plants and was also present in the mushrooms of this study. Report of Barros et al. (2013), also found it in the composition of *P. ostreatus* (4.35 ml/g) and *P. eryngii* (2.02 ml/g) and Finimundy et al. (2018) found this component in *Pleurotus sajor caju* (1.18 g/100dw).

According to the results of our study, it is likely that the activity of *P. florida* is not only related to the presence of phenolic organic compounds, but that other constituents present have influenced the inhibition of hatchability. Im et al. (2014) when evaluating the antioxidant activity of *P. florida* using different extracts, observed that the aqueous extract is less efficient as an antioxidant than alcoholic extracts using methanol and acetone. According to our data, the aqueous extract also did not present volatile compounds capable of providing antioxidant activity, but it had a great effect on hatchability inhibition.

In this study it was observed that the mushroom species have different amounts of total protein, with *P. ostreatus* being more proteinic than *P. florida* and *P. djamor*. However, *P. florida* was the species that showed the highest activity in inhibiting the hatchability of larvae.

It is concluded that *P. ostreatus* and *P. florida* have inhibited the hatchability of cyathostomins larvae and that further studies with *Pleurotus* spp should be carried out to be used as a possible alternative in the biological control of equine nematoids.

### **Acknowledgements**

The authors thank the following: Laboratório de Parasitologia Veterinária (LPAVET); Universidade Federal de Santa Maria (UFSM); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) for the funding.

### **Conflict of Interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **References**

- Alexandre, T.R et al.** (2017) Ergosterol isolated from the basidiomycete *Pleurotus salmoneostramineus* affects *Trypanosoma cruzi* plasma membrane and mitochondria. *Journal Of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases*, **23**,1-10.
- Anjos D.H.S & Rodrigues M.L.A.** (2006) Diversity of the infracommunities of strongylid nematodes in the ventral colon of *Equus caballus* from Rio de Janeiro state, Brazil. *Veterinary Parasitology*; 136, 251–257.
- Araújo J.V, Freitas B.W, Vieira T.C & Campos A.K** (2006). Avaliação do fungo predador de nematóides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides Papillosus* de caprinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **15**, 76-79.
- Badarina I, Putranto H.D & Sulistyowati E.** (2017) *In vitro* anthelmintic activity of coffee husk extract fermented with *Pleurotus ostreatus* for *Ascaridia galli*. *Animal Producti* **19**, 55-60.
- Barron GL & Thorn RG** (1987) Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. *Canadian Journal of Botany*.**65**, 774-778.

**Barros L, Pereira C & Ferreira I.C.F.R.** (2013) Optimized Analysis of Organic Acids in Edible Mushrooms from Portugal by Ultra Fast Liquid Chromatography and Photodiode Array Detection. *Food Analytical Methods* **6**, 309-316.

**Bevilaqua C.M.L, Rodrigues M.L.A & Concordet D.** (1993) Identification of infective larvae of some common nematode Strongylid of horses. *Revue Médecine Vétérinaire* **44**, 989-995.

**Bizimenyera, E.S., Githiori, J.B., Eloff, J.N. & Swan, G.E.** (2006) *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabacea) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology* **142**, 336–343.

**Bradford, M** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry* **72**, 248–254.

**Braga F.R, Araújo J.V, Soares F.E.F, Araujo J.M, Ferreira S.R, Tavela A.O, Silveira, W.F. & Queiroz J.H.** (2013) .Proteolytic action of the crude extract of *Duddingtonia flagrans* on cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae) in coprocultures. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **22**,143-146.

**Brugnari, T. Kato C.G., Correa V.G., Freitas E.N., Nolli M.M, Souza C.G.M.** (2016). Atividade antioxidante do extrato aquoso do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus*. *Revista Uningá Review*, Paraná **25**, 1-5.

**Canever R.J, Braga P.R.C, Boeckh A, Grycajuck M, Bier D & Molento M.B.** (2013). Lack of *Cyathostomin* sp. reduction after anthelmintic treatment in horses in Brazil. *Veterinary Parasitology* **194**, 35-39.

**Coles, G.C., Bauerb, C., Borgsteedec, F.H.M., Geertsd, S., Kleie, T.R., Taylora, M.A. & Wallerf, P.J.** (1992) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology* **44**, 35–44.

**Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., Von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A. & Vercruysse, J.** (2006) The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology* **136**, 167–185.

**Couto M.C.M, Quinelato S, Souza T.M, Santos C.N, Bevilaqua C.M.L Anjos D.H.S et al** (2009). Desenvolvimento e migração de larvas infectantes de ciatostomíneos (Nematoda: Cyathostominae) em gramínea coast cross (*Cynodon dactylon*) em clima tropical, na Baixada Fluminense, RJ, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **18**, 31-37.

**Cuevas-Padilla E.J, Aguilar-Marcelino L, Sánchez,J.E, González-Cortázar M, Zamilpa-Álvarez A, & Huicochea-Medina M, López-Arellano, M.E., Mendoza-de-Gives P., Hernández-Velázquez, V.M. & González-Garduño R.** (2018) *Pleurotus* spp. hydroalcoholic fraction possess a potent *in vitro* ovicidal activity against the sheep parasitic nematode *Haemonchus Contortus*. *Updates on Tropical Mushrooms. Basic and Applied Research* **1**, 194-211.

**Finimundya T.C, Barrosa L, Calhelha R.C, Alvesa M.J, Prieto M. A, Abreu, R.M.V, Dillon A. J.P, Henriques J.A.P, Roesch-Elyb M & Ferreira I. C.F.R.** (2018) Multifunctions of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer: A highly nutritious food and a source for bioactive compounds. *Food Chemistry* **245**, 150-158.

**Ganeshpurkar A, Bhadoriya S, Pardhi P & Rai G.** (2012) Investigation of anthelmintic potential of oyster mushroom *Pleurotus florida*. *Indian Journal of Pharmacology* **44**, 539-540.

**Genier HLA, Soares FEF, Queiroz JH, Gouveia A.S, Araújo JV, Braga FR, Pinheiro, IR & Kasuya, MCM.** (2015). Activity of the fungus *Pleurotus ostreatus* and of its proteases on *Panagrellus* sp. larvae. *Journal of Biotechnology* **14**, 1496-1503.

**Gordon, HM & Whitlock, AV.** (1939) A new technique for counting nematode eggs in sheep feces. *Journal Council Scientific Industry Research Australia* **12**, 50-52.

**Gronvold J, Henriksen S.A, Larsen M., Nansen P, Wolstrup J.** (1996) Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. *Veterinary Parasitology* **64**, 47-64.

**Guzmán G.** (2000) Genus *Pleurotus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* **2**, 1-29.

**Heydari R, Pourjam E & Goltapeh M.** (2006) Antagonistic Effect of Some Species of *Pleurotus* on the Root-knot Nematode, *Meloidogyne javanica* in vitro. *Plant Pathology Journal* **5**, 173-177.

**Hibbett DS, Thorn, RG** (1994) Nematode trapping in *Pleurotus tuberregium*. *Mycologia* **86**, 696–699.

**Im KH, Nguyen TK, Shin DB, Lee KR & Lee TS** (2014) Appraisal of Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Various Extracts from the Fruiting Bodies of *Pleurotus florida*. *Molecules* **19**, 3310-3326.

**Kaplan R.M.** (2002) Anthelmintic resistance in nematodes of horses. *Veterinary Research* **33**, 491–507.

**Kaplan R.M.** (2004) Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology* **20**, 478- 481.

**Kaplan, R.M.& Vidyashankar, A.N.** (2012) An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology* **186**, 70-78.

**Kurozawa L.E, Azoubel P.M, Murr F.E.X & Park K.J.** (2012). Drying kinetic of fresh and osmotically dehydrated mushroom (*Agaricus blazei*). *Journal of Food Process Engineering* **35**, 295–313.

**Kwok O.C.H., Plattner R, Weisleder D & Wicklow D.T.** (1992) A Nematicidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 35261. *Journal of Chemical Ecology* **18**, 128-136.



**Lyons, E.T, Tolliver, S.C & Collins, S.S.** (2011) Reduced activity of moxidectin and ivermectin on small strongyles in young horses on a farm (BC) in Central Kentucky in two field tests with notes on variable counts of eggs per gram of feces (EPGs). *Parasitology Research* **108**, 1315-1319.

**Lopes, A.C.G, Hiura, E, Soares, F.E.F, Fonseca L.A, Sena1, C.C, Ferraz1, Lacerda C.M.T., Senna1, T, Aguiar, A.R, Araújo, A.L Araújo, J.V. & Braga F.R.** (2015) Predatory Activity of the fungus *Pleurotus eryngii* on *Ancylostoma caninum* infective larvae. *Soj Veterinary Sciences* **1**, 1-6.

**Martínez-Soto G, Ocaña-Camacho R & Paredes-López O.** (2001) Effect of pretreatment and drying on the quality of oyster mushrooms (*Pleurotus Ostreatus*). *Drying technology* **19**, 661–672.

**Molento M.B, Antunes J, Bentes R.N & Coles GC.** (2008) Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. *Veterinary Record* **162**, 384-385.

**Molento, MB & Canever, RJ.** (2017). In vitro evaluation of ivermectin, moxidectin, albendazole and pyrantel against cyathostomins of horses. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **27**, 90-93.

**Mota M.A, Campos A.K, Araújo J.V.** (2003) Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **23**, 93-100.

**Nery, P.S et al.** (2010) Effects of *Anacardium humile* leaf extracts on the development of gastrointestinal nematode larvae of sheep. *Veterinary Parasitology* **171**, 361-364.

**Peregrine A.S, Molento M.B, Kaplan R.M & Nielsen M.K.** (2014) Anthelmintic resistance in important parasites of horses: Does it really matter? *Veterinary Parasitology* **201**,1–8.

**Pereira J.R & Vianna S.S.S.** (2008) Ecological aspects of small strongylids in the Paraíba Valley Region, State of São Paulo, Brazil, *Ciência Rural* **38**, 2264-2270.

**Pineda-Alegría J.Á, Sánchez-Vázquez J.E, Gonzaález-Cortazar M, Zamilpa A, López-Arellano M.E & Cuevas-Padilla E.J, Mendoza-de-Gives, P. & Aguilar-Marcelino, L.** (2017) The Edible Mushroom *Pleurotus djamor* Produces Metabolites with Lethal Activity Against the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. *Journal of Medicinal Food* 1-9.

**Phoon MC, Desbordes C, Howe J & Chow VTK.** (2001) Linoleic and linoleic acids differentially influence proliferation and apoptosis of Molt-4 leukaemia cells. *Cell Biology International*. **8**,777-784.

**Ramezani P, Hejazi S.H, Narimani M & Soleimanifard S.** (2017) *In vitro* antileishmanial activity and apoptosis induction of *Pleurotus ostreatus* alcoholic extract on *Leishmania major*. *Research Journal of Pharmacognosy* **4**, 51-58.

**Roberts FHS & Sullivan PJ.** (1950) Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastro-intestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research* **1**, 99-102.

**Robledo R.C, Aguilar M.L, Sánchez J.E, Mendoza D.G.P, López A.M.E, Olazarán J.S, Vega M.V.E, Olmedo J.A & Reyes G.D.E** (2015) Evaluación de extractos hidroalcohólicos del hongo comestible *Pleurotus djamor* contra el nematodo parásito de ovinos *Haemonchus contortus* L3. In: Basurto GR, Anaya EAM (Eds.), *Reunión Nacional de Investigación Pecuaría Memorias Innovación Sustentable para el Sector Pecuario.1*, 549-551.

**Rossano, M.G, Smith, A.R. & Lyons, E.T** (2010). Shortened strongyle-type egg reappearance periods in naturally infected horses treated with moxidectin and failure of a larvicidal dose of fenbendazole to reduce fecal egg counts. *Veterinary Parasitology*, **173**, 349-352.

**Satou T., Kaneko K., Li W & Koike K.** (2008) The Toxin Produced by *Pleurotus ostreatus* reduces the head size of nematodes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **31**, 574-576.

**Sufiate, B.L. Soares F.E.F , Gouveia A.S, Monteiro, T.S.A, Freitas, L.G. & Queiroz J.H** (2017) Nematicidal action of *Pleurotus eryngii* metabolites. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **12**, 216-219.

**Stadler M, Mayer A, Anke H & Sterner O.** (1994) Fatty Acids and Other Compounds with Nematicidal Activity from Cultures of Basidiomycetes. *Planta Medica* **60**, 128-132.

**Traversa D, Samson-Himmelstjerna G.V, Demeler J, Milillo P, Schürmann S, Barnes H, Otranto D, Perrucci S, di Regalbono A.F, Beraldo P, Boeckh A & Cobb R.** (2009). Anthelmintic resistance in cyathostomin populations from horse yards in Italy, United Kingdom and Germany. *Parasites & Vectors*; **2**, 1-7.

**Taofiq O., Heleno S.A., Calhelha R.C., Alves M.J., Barros L., Barreiro M.F, González-Paramás A.M & Ferreira I.C.** (2016) Development of Mushroom-Based Cosmeceutical Formulations with Anti- Inflammatory, Anti- Tyrosinase, Antioxidant, and Antibacterial Properties. *Molecules* **21**, 1-12.

**Tzelos, T., Morgan, E. R., Easton S, Hodgkinson, J.E. & Matthews J.B.** (2019) A survey of the level of horse owner uptake of evidence-based anthelmintic treatment protocols for equine helminth control in the UK. *Veterinary Parasitology* **274**, 1-6 .

**Von Samson-Himmelstjerna, G., Coles, G.C., Jackson, F., Bauer, C., Borgsteede, F., Cirak, V.Y., Demeler, J., Donnan, A., Dorny, P., Epe, C., Harder, A., Ho"glund, J., Kaminsky, R., Kerboeuf, D., Ku"ttler, U., Papadopou- los, E., Posedi, J., Small, J., Va´ rady, M., Vercruyse, J. & Wirtherle, N.** (2009) Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. *Parasitology Research* **105**, 825 – 834.

**Wartchow, F., Putzke, J., & Cavalcanti, M.A.Q** (2008). Agaricaceae Fr. (Agaricales, Basidiomycota) from areas of Atlantic Forest in Pernambuco, Brazil. *Acta Botanica Brasiliica* **22**, 287-299.

**Wille, C.N, Gomes, C.B., Minotto E., & Nascimento, J.S.** (2019) Potential of aqueous extracts of basidiomycetes to control root-knot nematodes on lettuce. *Horticultura Brasileira*, **37**, 54-59.

**Wolff, E.R.S, Wisbeck, E., Silveira, M.L.L, Gern, R.M.M., Pinho, M.S.L. & Furlan, A.S.,** (2008) Antimicrobial and Antineoplastic Activity of *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **151**,402–412.

**Table 1.** Lethal concentration of *Pleurotus ostreatus*, *P. florida* and *P. djamor* on hatchability of cyathostomins larvae

	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. florida</i>	<i>P. djamor</i>
LC <sup>50</sup> (%;p/v)	7.44 ± 0.09	2.13 ± 0.12	-
R square	0,8325	0,9466	-
N	15	15	-

\* LC<sup>50</sup>, Lethal concentration

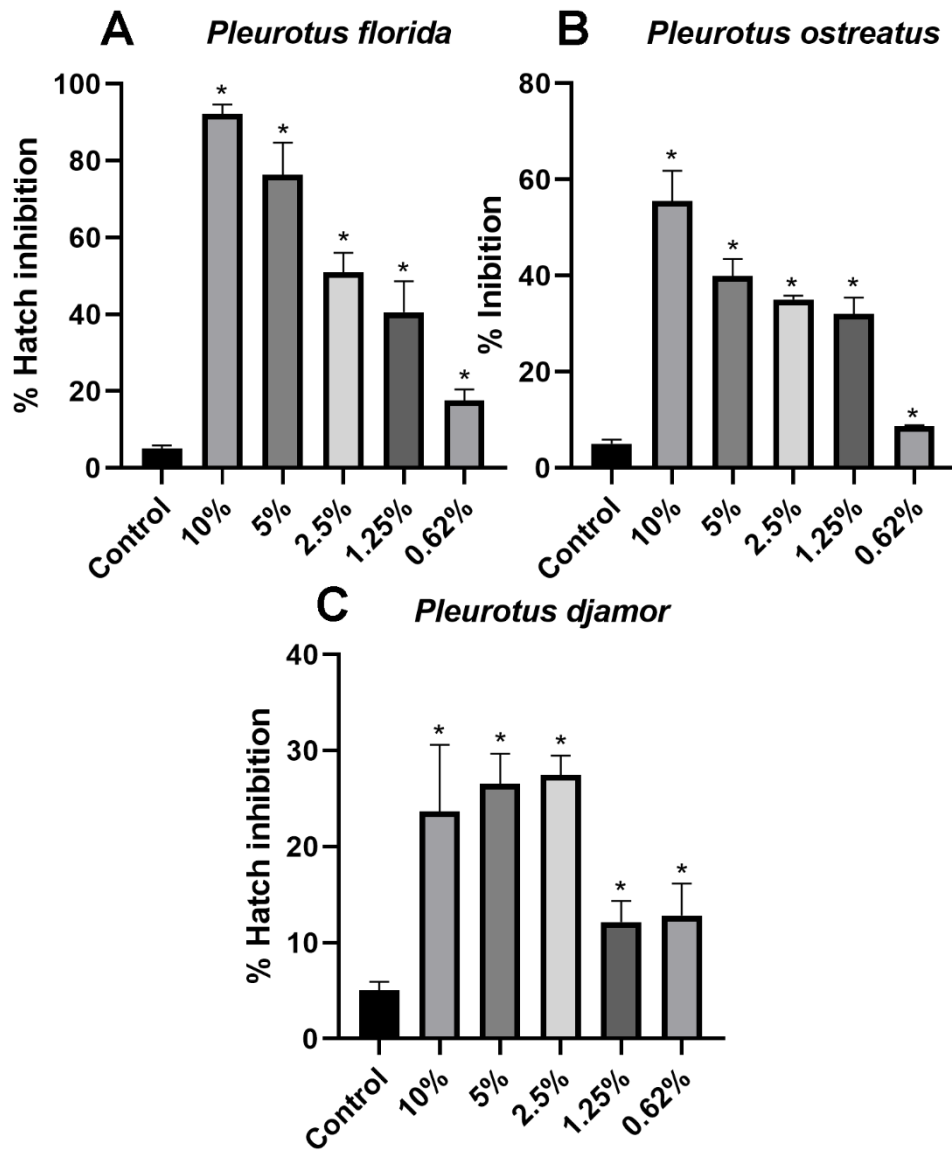


Figure 1. Activity of *Pleurotus florida* (A), *P. ostreatus* (B) e *P. djamor* (C) on inhibition of hatchability of cyathostomins larvae. Asterisk in columns indicate significant difference ( $P < 0.05$ )

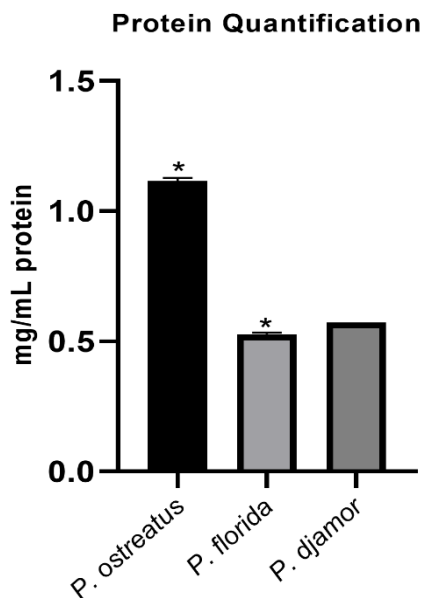


Figure 2. Total amount of proteins of *P. ostreatus*, *P. florida* and *P. djamor*. Asterisk in columns indicate significant difference ( $P < 0.05$ )

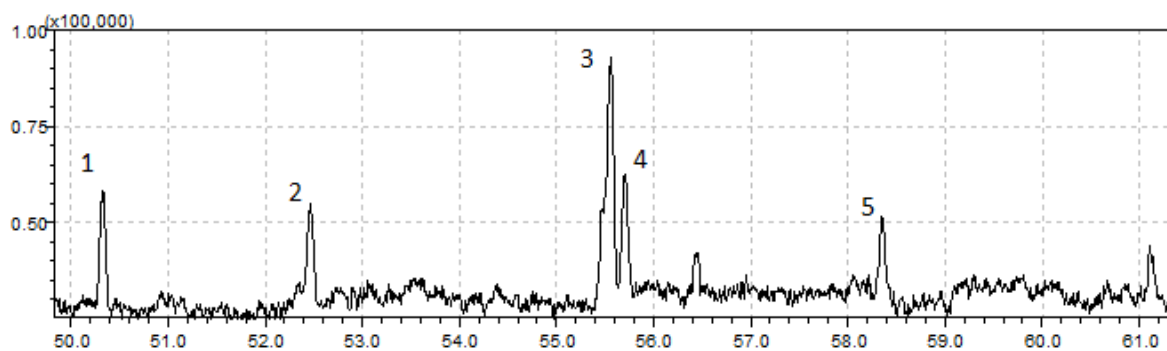


Figure 3. Gas chromatography coupled with mass spectrometry of volatile organic compounds of *P. ostreatus* extract. Tridecanoic acid (1), tetradecanoic acid (2), linolelaidic acid (3), 9,15 octadecadienic acid (4), oxalic acid (5).

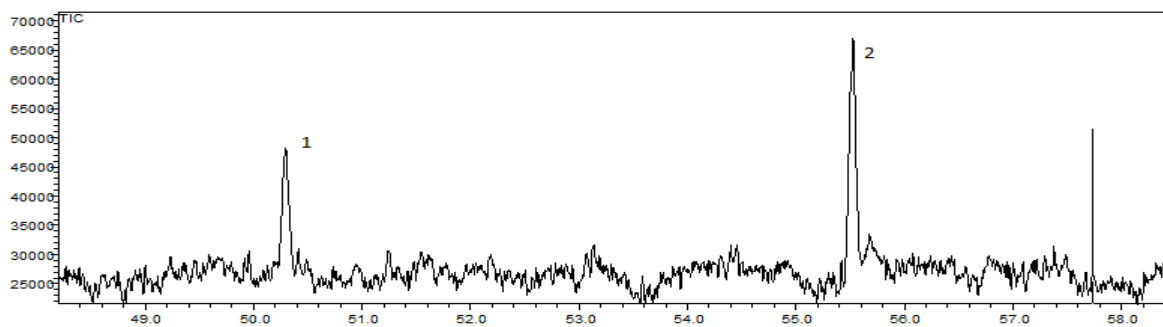


Figure 4 a. Gas chromatography coupled with mass spectrometry of volatile organic compounds from *P. djamor* aqueous extract. Tridecanoic acid (1), linolelaidic acid (2).

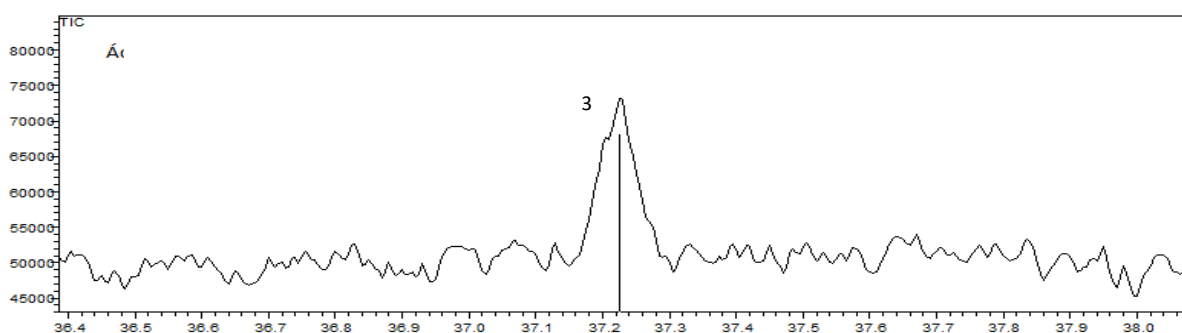


Figure 4 b. Gas chromatography coupled with mass spectrometry of volatile organic compounds from *P. djamor* aqueous extract. Undecanoic acid (3)

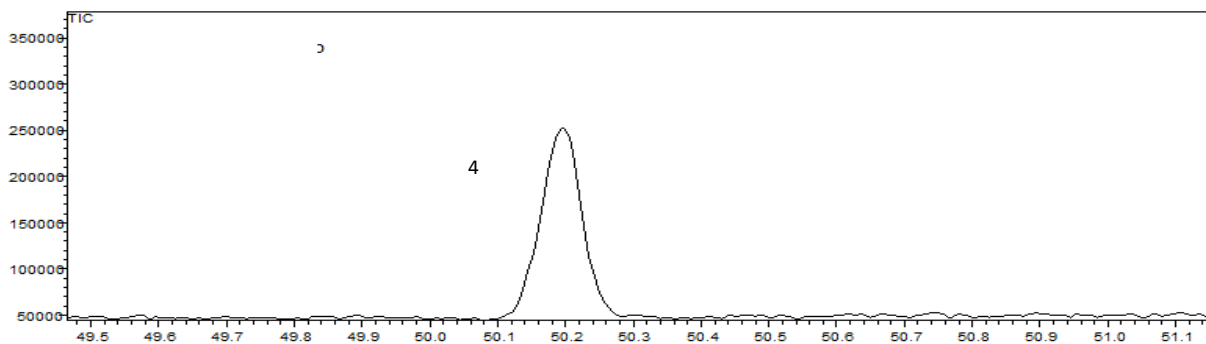


Figure 4 c. Gas chromatography coupled with mass spectrometry of volatile organic compounds from *P. djamor* aqueous extract. Tetradecanoic acid (4).

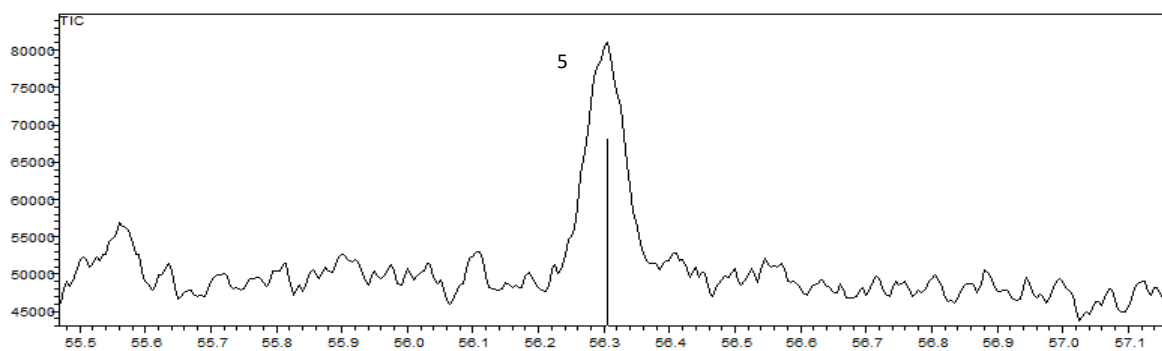


Figure 4 d. Gas chromatography coupled with mass spectrometry of volatile organic compounds from *P. djamor* aqueous extract. Oxalic acid (5).

## 4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que o extrato aquoso de cogumelos apresenta efeito sobre a eclodibilidade das larvas de ciatostomíneos. Sendo que o *P. florida* se mostrou mais eficaz quando comparado com os outros extratos.

O *P. florida* e *P. ostreatus* demonstraram ter ação sobre a eclodibilidade de larvas de ciatostomíneos. Os compostos orgânicos encontrados no *P. ostreatus* (ácido linolelaídico, ácido oxálico, ácido tridecanóico, ácido 9,15 octadecadienóico e ácido tetradecanóico) e *P. djamor* (ácido linolelaídico, ácido oxálico, ácido tridecanóico, ácido undecanóico e ácido tetradecanóico) podem ter influenciado na redução da eclodibilidade de larvas. Novos estudos devem ser realizados, a fim de avaliar quais compostos estão presentes no *P. florida* e quais realmente intervêm na eclodibilidade quando utilizados extratos do *P. ostreatus* e *P. djamor*, assim como, as formas de utilização dos cogumelos nos hospedeiros para o controle desses parasitos.



## REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. *Plant Pathology*, 5th ed., London, 2004.
- AHREN, D.; TUNLID, A. Evolution of parasitism in nematode-trapping fungi. **Journal of Nematology**, 35:194-197, 2003.
- ALAM, N. et al. Nutritional analysis of cultivated mushrooms in Bangladesh—*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus florida* and *Calocybe indica*. **Mycobiology**, v. 36, p. 228–232. 2008.
- AMARANTE, A.F.T. Controle integrado de helmintos de bovinos e ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.1, p.68-71, 2004.
- ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria, Anual. P. 309-3015, 2012.
- ARAÚJO, J.V.; MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K. Controle de helmintos de animais por fungos nematófagos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.0, p. 165-169, 2004.
- BARBOSA, P.B.D; BUDEL, J. MANFRON. **A HOMEOPATIA - BENEFÍCIOS NO TRATAMENTO DE EQUINOS**. Curitiba, p.1-13.2010.
- BASSAN, Lucas Maciel et al. ESTRONGILOSE: REVISÃO DE LITERATURA. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, São Paulo, v. 11, n. 6, p.1-7. 2008.
- BENEZ, S. M. **Manual de Homeopatia Veterinária: Indicações Clínicas e Patológicas: Teoria e Prática**. São Paulo: Editora Tecmedd, 2004.
- Brasil 2006. MAPA Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalos no Brasil. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Brasília: CNA; p.1- 72.
- BOWMAN, D. D. et al. **Parasitologia veterinária de Georgis**. 8. ed. Barueri: Manole, 2006. 422 p.
- CEZAR, Alfredo Skrebsky; CATTO, João Batista; BIANCHIN, Ivo. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 38, n. 7, p.2083-2091, out. 2008.
- CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W.; MITCHELL, D. J. Population development of *Heterodera glycines* in response to microflora in soil from Florida. **Biological Control**, v. 6, p. 226-231, 2004.
- CONDER, G.A.; CAMPBELL, W.C. Chemotherapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drug resistance. **Advances in Parasitology**, v.35, p.1-83, 1995.
- CONWAY, D P. Variance in the effectiveness of thiabendazole against *Haemonchus contortus* in sheep. **American Journal Of Veterinary Research**, v. 25, n. 106, p.844-846, 1964.

- CORNING, S. Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. **Parasites & Vectors**, v.2 n.2, p.1-6. 2009.
- COSTA, V.M.M. et al. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.31, p.65- 71, 2011.
- DIAS, Anderson Silva et al. Avaliação da eficácia de uma formulação comercial contendo torta de nim no controle de nematóides gastrintestinais de equinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, Viçosa, v. 8, n. 3, p.186-191, jan. 2014.
- DOBROWOLSKI, Elisa Cristina et al. Praziquantel and ivermectin efficacy in horses naturally infected with cyathostominae. **Rev. Acad. Ciênc. Anim**, Guarapuava, v. 14, n. 1, p.75-81. 2016.
- DRUDGE, J H et al. Strain variation in the response of sheep nematodes to the action of phenothiazine. II. Studies on pure infections of Haemonchus contortus. **American Journal Of Veterinary Research**, Kentucky Usa, v. 18, n. 67, p.317-325, 1957.
- DRUDGE, J H; ELAM, G. Preliminary observations on the resistance of horse strongyles to phenothiazine. **Journal Of Parasitology**, v. 47, n. 4, p.38-39, 1961.
- DRUDGE J.H.; LYONS E.T. Newer developments in helminth control and Strongylus vulgaris research. **Proc. 11 th Ann. Mtg. AAEP**, p. 381-389, 1965.
- DUNCAN, J.I.; PIRIE, H.m.. The Life Cycle of Strongylus vulgaris in the Horse. **Research In Veterinary Science**, [s.l.], v. 13, n. 4, p.374-385, jul. 1972.
- FERRAZ, S.; DIAS, C. R.; FREITAS, L. G. Controle de nematoides com práticas culturais. In: Zambolin, L. (Ed.). **Manejo integrado fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto**. Viçosa: UFV, p. 1-53, 2001.
- GIROTTO, Marcos José et al. O uso de fungos nematófagos no controle biológico de nematóides parasitas: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, São Paulo, v. 6, n. 10, p.1-7, jan. 2008.
- GRAMINHA, E. B. N.; MONTEIRO, A. C.; SILVA, H. C.; OLIVEIRA, G. P.; COSTA, A. J.; Controle de nematóides parasitos gastrintestinais por Arthrobotrys musiformis em ovinos naturalmente infestados mantidos em pastagens. **Pesq. Agropec. Brás**. Brasília, v.40, n.9, p.927-933, set. 2005.
- GRAY, N. F. Fungi attacking vermiform nematodes. In: Poinar Junior, G. O. & Jansson, H. G. (Eds.). **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC Press, p. 3-38, 1988.
- GRONVOLD J, HENRIKSEN SA, LARSEN M., NANSEN P, WOLSTRUP J. Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. **Vet Parasitol**; v. 64, p. 47-64. 1996.
- GUNDE-CHIMERMAN, N. Medicinal Value of the Genus Pleurotus (Fr.) P. Karst (Agaricales S.L. Basidiomycetes). **Int. J. Med. Mushroom** 1999, 1, 69–80.
- GUZMAN, Gaston. Genus Pleurotus (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae). **International Journal Of Medicinal Mushrooms**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.1-29, 2000.

HUANG, X.W.; ZHAO, N.H.; ZHANG, K.Q. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. **Research Microbiology**, v. 155, p. 811–816, 2004.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal. 2016. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rs/pesquisa/18/16459>. Acesso em: 24 mar. 2019.

JANSSON, H. B.; TUNLIB, A.; NORDBRING-HERTZ, B. Biological control: Nematodes. In: Anle, T. (Ed). **Fungal Biotechnology**. Weinheim: Chapman and Hall. p. 38-50. 1997.

KAPLAN, R.M. Anthelmintic resistance in nematodes of horses. **Veterinary Research**. v.33, p.491–507, 2002.

KHAN, Md. Asaduzzaman; TANIA, Mousumi. Nutritional and Medicinal Importance of *Pleurotus* Mushrooms: An Overview. **Food Reviews International**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.313-329, jul. 2012.

KERRY, B.R., SIMONN, A.; ROVIRA, A.D. Observations on the introductions of *Verticillium chlamydosporium* and other parasitic fungi into soil for control of the cereal cyst-nematode *Heterodera avenae*. **Annals of Applied Biology**, v.105, n.3, p.509-516. 1984.

KÖHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 31. p. 336-345, 2001.

KWOK OCH., Plattner R, Weisleder D, Wicklow DT. A Nematicidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 35261. **Journal of Chemical Ecology**.v.18 n.2 p.128-136. 1992

LA GUARDIA, M., VENTURELLA, G., VENTURELLA, F. On the chemical composition and nutritional value of *Pleurotus* taxa growing on umbelliferous plants (Apiaceae). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53 n.15, p. 5997-6002, 2005.

LAGAGGIO, V. R. A.; JORGE L. L.; OLIVEIRA V.; FLORES M. L.; SILVA J. H. Achados de formas parasitárias em camas de equinos. Santa Maria: [s.n.], 2007.

LICHTENFELS, J. R., KHARCHENKO, V. A., DVOJNOS, G. M. Illustrated identification keys to strongylid parasites (Strongylidae: Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae). **Veterinary Parasitology**, v.1, n.4, p. 156-161. 2008.

LOVE, S., MURPHY, D. MELLOR, D. Pathogenicity of cyathostome infection. **Veterinary Parasitology**, v. 85 n.2-3 p. 113-122,1999.

LYONS, E. T., DRUDGE, J. H. & TOLLIVER, S. C. Larval cyathostomiasis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v.16, n.3, p.501-513.2000.

MACHADO, A.C. Z; KANEKO, L; PINTO, Z.V. Controle biológico. In: GALBIERI, Rafael; BELOT, Jean Louis. **Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros**: Biologia e medidas de controle. 3. ed. Cuiabá: Boletim de P&d, 2016. Cap. 8. p. 287-312.

MADEIRA DE CARVALHO L.M. **ESTRONGILIDOSE DOS EQUÍDEOS BIOLOGIA, PATOLOGIA, EPIDEMIOLOGIA E CONTROLO.** 2006.

MANKAU, R. Biocontrol: fungi as nematode control agents. **Journal of Nematology**, v. 12 p. 244-252, 1980.

MARTINS, Natália Soares et al. Ciatostomíneos: uma revisão sobre a biologia, importância clínica e controle. **Pubvet**, [s.l.], v. 13, n. 2, p.1-7, fev. 2019.

MOLENTO, Marcelo Beltrão. Resistência parasitária em helmintos de equídeos e propostas de manejo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 6, n. 35, p.1469-1477, nov. 2005.

MOLENTO M.B.; ANTUNES J.; BENTES R.N. COLES G.C. Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. **Vet Rec.** v.162 n.12, p.384-5, 2008.

MONTEIRO, S.G. **Parasitologia na Medicina Veterinária.** 2. ed. Rio de Janeiro: Roca Ltda, 2017.

MORALES, R. E. V. **Terapia homeopática con nosodes en el control de la mastitis subclínica bovina.** (2004) Tesis (Máster en Medicina Preventiva Veterinária Mención Salud Animal), Universidad Central de las Villas “Marta Abreus”, Cuba, 2004.

MOTA MA, CAMPOS AK, ARAÚJO JV. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesq Vet Bras**; v. 23 n.3 p. 93-100. 2003.

NASCIMENTO, Ana Gabriela C. R. do et al. Ocorrência de nematóides em equídeos na região norte do Estado do Tocantins, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Tocantins, v. 17, n. 1, p.178-181, 2008.

OLIVEIRA, Mariana Alves de et al. Produção de inóculo do cogumelo comestível *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quélet - CCB19 a partir de resíduos da agroindústria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 27, p.84-87, ago. 2007.

OYETAYO, F.L.; AKINDAHUNSI, A.A.; OYETAYO, V.O. Chemical profile and amino acids composition of edible mushrooms *Pleurotus sajor-caju*. **Nutr. Health**, v. 18, p. 383–389, 2007

PEREGRINE, A. S., MCEWEN, B., BIENZLE, D., KOCH, T. G. & WEESE, J. S. Larval cyathostomiasis in horses in Ontario: an emerging disease? The **Canadian Veterinary Journal**, v. 47 n.1, p. 80-82. 2006.

PIEREZAN, F., RISSI, D. R., OLIVEIRA FILHO, J. C., LUCENA, R. B., TOCHETTO, C., FLORES, M. M. BARROS, C. S. L. Enterite granulomatosa associada a larvas de ciatostomíneos em equinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n.5, p.382-386.2009.

PINEDA-ALEGRÍA JÁ, SÁNCHEZ-VÁZQUEZ JE, GONZAÁLEZ-CORTAZAR M, ZAMILPA A, LÓPEZ-ARELLANO ME, CUEVAS-PADILLA EJ, et al. The Edible Mushroom *Pleurotus djamor* Produces Metabolites with Lethal Activity Against the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. **Journal of Medicinal Food** p. 1-9, 2017.

REINEMEYER, C. R. & NIELSEN, M. K. Handbook of equine parasite control. Iowa, USA. **WileyBlackwell.** 2013.

- SANGSTER, N. C. & DOBSON, R. J. Anthelmintic Resistance. In: THE BIOLOGY of Nematodes. [S.l.]: D. Lee, Taylor and Francis. p. 531-567, 2002.
- SARANGI, Itisam et al. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. **International Immunopharmacology**, [s.l.], v. 6, n. 8, p.1287-1297, ago. 2006.
- SARTORI FILHO, R.; AMARANTE, A.F.T.; OLIVEIRA, M.R. Efeitos de medicação anti-helmintica com ivermectina e fenbendazole em equinos: Exame coprológico e hematológico. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2, n. 1, p. 61-64, 1993.
- SHARON, E.; BAR-EYAL, I.; CHET, A.; HERRERA-ESTRELLA, O.; SPIEGEL, Y. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 91 p.687-693, 2001.
- SILVA, H. M. Nematodioses gastrintestinais de caprinos: uma revisão. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 13, n. 2, p. 199–208, 2014.
- SOARES, P. L. M. **Estudo do controle biológico de fitonematóides com fungos nematófagos**. 2006. 217 p. Tese (Doutorado em Agronomia- Entomologia Agrícola) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2006.
- SUAREZ, B.; REY, M.; CASTILLO, P. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from biocontrol agente *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematicidal activity. **Applied Microbiol Biotechnological**, v. 65, p. 46-55, 2004.
- TAYLOR, M. A., COOP, R. L. WALL, R. L. *Parasitologia Veterinária*. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, 2017.
- TRAVERSA, Donato et al. Anthelmintic resistance in cyathostomin populations from horse yards in Italy, United Kingdom and Germany. **Parasites & Vectors**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.1-7, jan. 2009.
- URQUHART, G. M.(1996) *Veterinary parasitology*, Blackwell Science.
- VIEIRA, L. S. Alternativas de controle de verminose gastrintestinal dos pequenos ruminantes. **EMBRAPA CAPRINOS**, Sobral, 2003.
- VIEIRA, L. S. **Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos**. 3º **Simpósio Internacional sobre caprinos e ovinos de corte**. João Pessoa, v.2, n.2, p. 49-56. 2007.
- WALLER, P.J. Global perspectives on nematode parasite control in ruminant livestock: the need to adopt alternatives to chemotherapy, with emphasis on biological control. In: FAO. Animal Production and Health Division. Biological control of nematode parasites of small ruminants in Asia. **Animal Production and Health Paper**. Italy p.104, 2002.
- WARTCHOW, F. Putzke, J. & Cavalcanti M.A.Q. Agaricaceae Fr. (Agaricales, Basidiomycota) from areas of Atlantic Forest in Pernambuco, Brazil. **Acta Botanica Brasilica** n. 22, p. 287-299. 2008.
- YASHVANT, P.; NARAIAN, R.; SINGH, V.K. Medicinal Properties of *Pleurotus* Species (Oyster Mushroom): A Review. **World Journal of Fungal and Plant Biology**, v. 3, n.1, p. 01-12, 2012.