

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ATIVIDADE NEMATICIDA DO FUNGO *Pleurotus* spp SOBRE  
LARVAS INFECTANTES DE *Ancylostoma caninum***

**ALINE DEL CARMEN GARCIA LOPES**

**VILA VELHA  
FEVEREIRO / 2015**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ATIVIDADE NEMATICIDA DO FUNGO *Pleurotus* spp SOBRE  
LARVAS INFECTANTES DE *Ancylostoma caninum***

Dissertação apresentada à  
Universidade Vila Velha, como pré-  
requisito do Programa de Pós-  
graduação em Ciência Animal, para a  
obtenção do grau de Mestre em  
Ciência Animal

**ALINE DEL CARMEN GARCIA LOPES**

**VILA VELHA**  
**FEVEREIRO / 2015**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

L864a Lopes, Aline del Carmen Garcia.

Atividade nematicida do fungo *Pleurotus* spp sobre larvas infectantes de *Ancylostoma caninum* / Aline del Carmen Garcia Lopes. – 2015.

62 f.: il.

Orientador: Fabio Ribeiro Braga.

Dissertação (mestrado em Ciência Animal) - Universidade Vila Velha, 2015.

Inclui bibliografias.

1. Helminologia veterinária. 2. Sistemas de controle biológico. 3. Fungos nematófagos. I. Braga, Fabio Braga. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 636.08944

**ALINE DEL CARMEN GARCIA LOPES**

**ATIVIDADE NEMATOCIDA DO FUNGO *Pleurotus* spp SOBRE  
LARVAS INFECTANTES DE *Ancylostoma caninum***

Dissertação apresentada à  
Universidade Vila Velha, como pré-  
requisito do Programa de Pós-  
graduação em Ciência Animal, para a  
obtenção do grau de Mestre em  
Ciência Animal

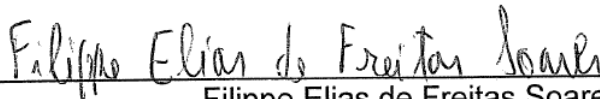
Aprovada em 09 de fevereiro de 2015

Banca Examinadora:



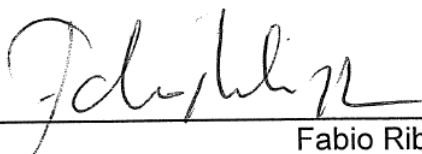
---

Leandro Abreu da Fonseca (UFV)



---

Filipe Elias de Freitas Soares (UVV)



---

Fabio Riberio Braga (UVV)  
(orientador)

## AGRADECIMENTO

Agradeço a minha mãe Mónica pelo amor incondicional, por sempre acreditar, apoiar e incentivar minha carreira profissional e também me ensinar a ser uma pessoa melhor a cada dia. Sem ela, nada disso teria sido possível.

Agradeço também ao meu namorado Leonardo, por me apoiar e me ouvir nos momentos difíceis que passei durante esses dois anos de crescimento profissional e pessoal. Por todo amor e companherismo que não me deixaram desistir dos meus sonhos.

A minha família, meus avós queridos e tios, que sempre me apoiaram e demonstraram seu amor toda vez que perguntaram se eu precisava de alguma ajuda.

A minha prima Fernanda, por me ajudar na parte técnica de alguns experimentos por diversas vezes. Obrigada pelos momentos divertidos que passamos dentro do laboratório, mesmo fazendo você sair depois da meia noite várias vezes.

A minha amiga Emy, por me escutar e ficar do meu lado sempre que eu contava os meus problemas. Pelos pensamentos positivos de que tudo daria certo, não me deixando desistir e estando comigo até o final.

Agradeço ao meu orientador Fábio Ribeiro Braga por me acolher quando mais precisei nessa jornada, acreditando em mim e em minha capacidade de superação. Por acreditar que seria possível realizar um novo trabalho em um curto espaço de tempo. Obrigada pela oportunidade, paciência e pela confiança depositada em mim para realização deste trabalho.

Agradeço ao professor Tadeu Uggere de Andrade por ser um amigo e me apoiar desde o início dessa caminhada. Por abrir seu laboratório e me acolher como sua própria aluna, me apoiando e me dando a oportunidade de aprender e conviver em um ambiente com pessoas éticas e profissionais. Muito obrigada pela confiança depositada em mim.

Ao professor Thiago de Melo Costa Pereira, que sempre que necessário disponibilizou seu tempo para tirar minhas dúvidas, me ensinar e contribuir com todo seu conhecimento para realização de alguns projetos.

A todos os funcionários da UVV, que estão envolvidos de alguma forma nessa jornada. Obrigada pelo ajuda.

A Universidade de Vila Velha e Universidade Federal de Viçosa que proporcionou suporte e material para a execução do projeto de pesquisa.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Ciclo biológico de infecção por Ancilostomídeos em humanos. Adaptada de <http://www.cdc.gov/dpdx/hookworm/>.

**Figura 2:** Ciclo biológico de infecção por Ancilostomídeos em cães e gatos. Adaptada de <http://www.cdc.gov/dpdx/hookworm/>.

**Figura 3:** Larva de *Ancylostoma caninum* (seta preta), hifas de *Pleurotus eryngii* (seta branca) e gotícula produzida pelo fungo (seta amarela). Microscopia de luz - objetiva de 10x.

**Figura 4:** A – Larva de *Ancylostoma caninum* com hifa do fungo *Pleurotus eryngii* (seta preta). B, C e D – Larva de *Ancylostoma caninum* com gotículas produzidas pelo fungo *Pleurotus eryngii* em contato com a superfície da larva (seta preta). Microscopia de luz - objetiva de 10x.

**Figura 5:** A - Larva de *Ancylostoma caninum* com gotículas produzidas pelo fungo *Pleurotus eryngii* em contato com a superfície da larva (seta preta). B e C - Larva de *Ancylostoma caninum* com gotículas produzidas pelo fungo *Pleurotus eryngii* no interior da larva (seta preta). D - Larva de *Ancylostoma caninum* com gotículas produzidas pelo fungo *Pleurotus eryngii* no interior da larva (seta preta) e início da predação da larva pelo fungo. Microscopia de luz - objetiva de 10x.

**Figura 6:** Larva de *Ancylostoma caninum* digerida por ação do fungo *Pleurotus eryngii*. Microscopia de luz - objetiva de 10x.

**Figura 7:** Média das larvas contadas e desvio padrão (barra) do grupo tratado (cinza escuro) e do grupo controle (cinza claro).

Comparação entre colunas cinza claro e cinza escuro: \*Média dos grupos tratado e controle do respectivo dia diferem entre si ( $p < 0,01$ ).

Comparação entre colunas cinza escuro: # A média do grupo tratado difere ( $p < 0,01$ ) da média referente ao grupo tratado do dia 1.

**Figura 8:** Curva de regressão linear calculada através das médias das larvas de *Ancylostoma caninum* do grupo Controle em função do tempo (dias 1 ao 7).

**Figura 9:** Curva de regressão linear calculada através das médias das larvas de *Ancylostoma caninum* do grupo Tratado em função do tempo (dias 1 ao 7).



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Eficiência do isolado fúngico de *Pleurotus eryngii* na redução do número de larvas L<sub>3</sub> de *Ancylostoma caninum*. Comparação entre as linhas, das médias seguidas do percentual de redução.

**Tabela 2:** Eficiência do isolado fúngico *Pleurotus eryngii* na redução do número de larvas L<sub>3</sub> de *Ancylostoma caninum* durante 7 dias consecutivos.

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AA 1% - Ágar-água 1%.

μl - Microlitros

cm – Centímetro

CO<sub>2</sub> – Gás Carbônico

L<sub>3</sub> – Larva de terceiro estágio

ml - mililitro

mm- Milímetros

g - Gramos

°C - grau Celsius

% - percentagem

< - menor que

NaCl - Cloreto de Sódio

## RESUMO

**LOPES, Aline del Carmen Garcia;** MSc; Universidade Vila Velha – ES, Fevereiro de 2015; **Atividade nematocida do fungo *Pleurotus* spp sobre larvas infectantes de *Ancylostoma caninum*;** Orientador: Fabio Ribeiro Braga.

Os cães e gatos desempenham importante papel como animais de companhia para os seres humanos, que acabam estabelecendo laços afetivos com esses animais. O estreitamento dessa relação aumenta o risco de contaminação do homem, podendo estes animais serem considerados reservatórios potenciais de agentes infecciosos. Dentre os helmintos, o *Ancylostoma* spp tem despertado grande interesse, devido ao seu potencial zoonótico. O *Ancylostoma caninum* é a espécie mais comum em cães e o *A. braziliense* é o mais comum em gatos. Os fungos nematófagos são estudados desde que sua função como predador de nematóides foi reconhecida no final do século XIX. Dessa forma, o controle biológico consiste na aplicação e utilização de antagonistas naturais disponíveis no ambiente e que possam diminuir, a um limiar aceitável, determinada população do agente agressor. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade predatória de isolados fúngicos de *Pleurotus eryngii* *in vitro* sobre *A. caninum* de cães residentes no Estado do Espírito Santo. Os dados foram interpretados estatisticamente pela análise de variância em níveis de significância de 1 e 5% de probabilidade. A eficiência de predação das larvas em relação ao controle foi avaliada pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. Posteriormente, o percentual de redução da média de L<sub>3</sub> foi calculado. Foi realizado um ensaio experimental *in vitro* e confeccionadas 15 placas para o grupo tratado e 15 placas do grupo controle. No grupo tratado, em cada placa de Petri foram colocadas 1000 larvas de *A. caninum* e 50 microlitros do isolado fúngico. No grupo controle foram colocadas somente 1000 larvas. O isolado fúngico de *P. eryngii* reduziu o número médio de larvas de *A. caninum* em relação ao controle ( $p < 0,01$ ) e apresentou um percentual de redução de 47,56%. O número médio de larvas recuperadas no grupo tratado foi de 32,2 ( $\pm 15,3$ ) e do grupo controle foi 72,88 ( $\pm 27,0$ ). Foi calculada a média das larvas contadas durante cada um dos 7 dias do experimento no grupo controle e tratado e encontraram-se valores significativos ( $p < 0,01$ ) entre as médias dos dois grupos. Foi observada a diminuição consecutiva do dia 1 ao dia 7 em relação ao número de larvas dos dois grupos ( $p < 0,01$ ). Concluiu-se com isso, que o fungo *P. eryngii* demonstrou atividade predatória sobre L<sub>3</sub> de *A. caninum*, podendo ser uma alternativa de controle.

Palavras-chaves: ancilostomídeos, controle biológico, fungos nematófagos

## ABSTRACT

**LOPES, Aline del Carmen Garcia;** MSc; Universidade Vila Velha – ES, Fevereiro de 2015; **Nematicide activity of *Pleurotus* spp fungus on infective larvae of *Ancylostoma caninum*;** Orientador: Fabio Ribeiro Braga.

Dogs and cats play an important role as companion animals to humans, who end up establishing emotional bonds with these animals. The closer this relationship higher the risk of contamination, and these animals can be considered as potential reservoirs of infectious agents. Among the helminths, *Ancylostoma* spp has attracted great interest because of its zoonotic potential. The *Ancylostoma caninum* is the most common species in dogs and *A. braziliense* is most common in cats. Nematophagous fungi are studied since its function as predator nematodes was recognized in the late nineteenth century. Thus, the biological control is the application and use of natural antagonists available in the environment and can reduce to an acceptable threshold given population of the offending agent. The objective of this project was to evaluate the predatory activity of fungal isolates of *Pleurotus eryngii in vitro* on *A. caninum* State resident dogs of Espirito Santo. The data were interpreted by analysis of variance at significance levels of 1 and 5% probability. The efficiency of predation of larvae in the control was evaluated by the Tukey test at 1% probability. Subsequently, the average reduction percentage was calculated  $L_3$ . An experimental *in vitro* assay was performed and made 15 boards for the treated group and 15 boards in the controlled group. In the treated group, in each Petri dish were placed 1000 larvae of *A. caninum* and 50 microliters of the fungal isolate. In the controlled group were placed only 1000 larvae. The fungal isolate of *P. eryngii* reduced the average number of larvae of *A. caninum* compared to control ( $p < 0.01$ ) and presented a 47.56% reduction percentage. The average number of larvae recovered in the treated group was 32.2 ( $\pm 15.3$ ) and the control group was 72.88 ( $\pm 27.0$ ). We calculated the average of larvae were counted in each of the seven days of the experiment in the control group and treated and found significant differences ( $p < 0.01$ ) between the average of two groups. Consecutively reduction was observed from day 1 to day 7 compared to the number of larvae in both groups ( $p < 0.01$ ). It follows from this that the fungus *P. eryngii* showed predation on  $L_3$  of *A. caninum*, which can be a control alternative.

Keywords: hookworms, biological control, nematophagous fungi

## SUMÁRIO

|   |      |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS .....                                      | vi   |
| LISTA DE TABELAS .....                                      | viii |
| LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS .....                      | ix   |
| RESUMO .....  | x    |
| ABSTRACT .....  | xi   |
| 1. Introdução .....   | 13   |
| 2. Revisão de Literatura .....                              | 15   |
| 2.1. <i>Histórico</i> .....                                 | 15   |
| 2.2. <i>Fungos Nematófagos</i> .....                        | 16   |
| 2.3. <i>Fungos produtores de metabólitos tóxicos</i> .....  | 18   |
| 2.4. <i>Fungos ovicidas</i> .....                           | 21   |
| 2.5. <i>Fungos endoparasitas</i> .....                      | 21   |
| 2.6. <i>Fungos predadores</i> .....                         | 22   |
| 2.7. <i>Controle Biológico</i> .....                        | 24   |
| 2.8. <i>Pleorotus spp</i> .....                             | 26   |
| 2.9. <i>Ancilostomídeos</i> .....                           | 29   |
| 3. Objetivo .....   | 34   |
| 4. Material e métodos .....                                 | 36   |
| 4.1. <i>Obtenção dos isolados fúngicos</i> .....            | 36   |
| 4.2. <i>Obtenção dos conídios</i> .....                     | 36   |
| 4.3. <i>Obtenção de larvas de Ancylostoma caninum</i> ..... | 36   |
| 4.4. <i>Ensaio experimental</i> .....                       | 37   |
| 4.5. <i>Análise estatística</i> .....                       | 37   |
| 5. Resultados e Discussão.....                              | 38   |
| 6. Conclusão .....  | 50   |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                            | 51   |

## INTRODUÇÃO

O parasita é um organismo que leva vantagem sobre outro organismo (hospedeiro) e geralmente causa algum dano a ele. Estes parasitas constituem um grupo diversificado de organismos que podem afetar uma ampla gama de hospedeiros animais, incluindo os anfíbios, aves, peixes, mamíferos e répteis (1). Os cães apesar dos benefícios que apresentam como animais de companhia, podem ser considerados reservatórios de agentes infecciosos como parasitos, bactérias, vírus e fungos, podendo ser importante fonte de contaminação e risco à saúde humana. Devido ao seu potencial zoonótico, dentre os helmintos gastrointestinais, o *Ancylostoma* spp tem despertado grande atenção (2). Ancilostomídeos são um dos nematóides parasitas mais comuns que infectam mamíferos, incluindo os seres humanos, cães, gatos e canídeos silvestres (3). O *Ancylostoma caninum* e o *Ancylostoma braziliense*, são geohelmintos intestinais de cães e gatos e têm requerido grande atenção devido ao seu potencial zoonótico por meio direto da contaminação do solo com as fezes de animais parasitados (4).

Nos dias atuais, buscam-se medidas alternativas para o controle destas e de outras endoparasitoses de animais domésticos, visando a diminuição do emprego de quimioterápicos e, conseqüentemente, a redução dos níveis de poluentes no ambiente e nos produtos de origem animal (5). Segundo Frassy et al., é importante que métodos de prevenção e alternativas de controle de geo-helmintos sejam implantados para reduzir a contaminação ambiental das formas infectantes e de seus ovos (6). Com o intuito de melhorar esse controle, sugere-se o controle biológico, como uma alternativa viável e promissora que reduz as infecções causadas por helmintos parasitos gastrintestinais, e cuja ação se dá por meio de organismos vivos que atuam como antagonistas naturais no ambiente (4, 7).

Entre esses antagonistas estão os fungos nematófagos que possuem a capacidade predatória sobre helmintos. Os fungos nematófagos constituem uma opção ao controle dos nematoides gastrintestinais de animais domésticos. Sua ação está concentrada no ambiente fecal e direcionada ao combate das larvas de vida livre dos parasitos (8, 9). Fungos nematófagos compreendem aqueles fungos que atacam nematóides vivos e/ou seus ovos e os utilizam como fonte de nutrientes (10). As espécies de fungos predadores variam em sua capacidade de capturar os nematoides. Trata-se dos organismos mais estudados e que apresentam maior potencial de serem comercializados, principalmente pelo seu maior isolamento e

facilidade de cultivo em laboratório. As espécies *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrobotrys robusta* são identificadas como nematófagas e têm sido estudadas quanto ao seu potencial como agentes controladores biológicos de nematoides gastrintestinais de animais domésticos (5, 11). Outro gênero de fungos também com função nematófaga é o *Pleurotus* spp, que são naturalmente encontrados em madeira em decomposição e também são cultivados comercialmente em muitos países para o consumo humano. Por outro lado, estes fungos são capazes de produzir pequenos botões esféricos que contêm Nematotoxin, toxina capaz de imobilizar os nematóides que entram em contato com o fungo (12).

Thorne e Barron foram os primeiros a relatar que fungos decompositores de madeira possuem a capacidade de capturar, matar e digerir nematoides (12). Estes autores relataram que 11 espécies de fungos pertencentes à ordem Agaricales, incluindo *Pleurotus ostreatus*, têm a capacidade de matar nematoides de galhas. Também Palizi et al., relataram que esta espécie reduziu a formação de cistos do nematoide *Heterodera schachtii* (13).

Diante desse cenário faz-se importante avaliar a eficiência de isolados fúngicos de *Pleurotus eryngii* no controle de larvas de *Ancylostoma caninum*.

## REVISÃO DE LITERATURA

### **Histórico**

A primeira citação de um fungo nematófago surgiu no século XIX. Os primeiros registros foram feitos por Lohde em 1874, com o fungo *Harposporium anguillulae*. Posteriormente em 1852, Fresenius estudava o fungo nematófago *Arthrobotrys oligospora*, porém somente Zoph em 1888 fez as primeiras observações da captura de um nematóide vivo através do fungo *Arthrobotrys oligospora* (14).

As pesquisas com fungos nematófagos, como possíveis agentes biológicos no controle de nematóides, tiveram início no século XX na França entre as décadas de 30 e 40. Drechsler em 1937 publicou um estudo que continha informações detalhadas sobre algumas espécies que haviam sido descritas e mais 15 outras ainda desconhecidas, contribuindo de forma significativa, uma vez que até então pouco se conhecia a respeito desses fungos (5, 15).

Em 1939, Descazeaux, iniciou os primeiros experimentos *in vitro* nos quais estudou a ação predatória de quatro fungos em diferentes espécies de larvas de nematóides de animais. Os trabalhos de Duddington, de 1950 a 1972, e Barron a partir de 1969, foram de importante contribuição na área de isolamento e descrição de novas espécies no controle biológico de helmintos (16).

A partir da década de 60 vários novos gêneros foram descritos, incluindo *Duddingtonia*, *Monacrosporium*, *Genicularia* e *Dactylariopsis* porque até então grande parte dos fungos ainda era classificada como pertencentes aos gêneros *Arthrobotrys* Corda, *Dactylaria* Saccardo, *Dactyella* Grove e *Trichothecium* Link (9).

No Brasil, dois grupos de Minas Gerais, um da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e outro da Embrapa Gado de Leite foram os responsáveis pelas primeiras pesquisas com fungos nematófagos, iniciadas na década de 1990 (17). O grupo de Viçosa desenvolveu trabalhos pioneiros no Brasil, utilizando fezes de animais domésticos, nas quais determinaram o efeito antagônico dos fungos predadores do gênero *Arthrobotrys* e *Monacrosporium* sobre larvas de *Haemonchus placei*, e posteriormente *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Toxocara canis*. Demonstraram que *Monacrosporium elliposporum* e *Arthrobotrys* spp foram eficazes no controle de larvas de *Haemonchus placei* em condições laboratoriais, e que havia variações na capacidade predatória de diferentes isolados dentro da mesma espécie de *Arthrobotrys* (18-21). O grupo da Embrapa demonstrou que a



eficácia de um isolado de *Arthrobotrys oligospora* era dependente da dose de esporo contida nas fezes e que o mesmo isolado, quando comparado a *Duddingtonia flagrans*, apreendia número maior de larvas infectantes de nematóides Trichostrongilídeos em menor tempo e com menor número de esporos (22).

Em 1984, Thorn e Barron, foram os primeiros a demonstrar que os fungos pertencentes ao gênero *Pleurotus* eram capazes de atacar e consumir nematóides de vida livre (12). Em culturas de *Pleurotus*, os nematóides ficaram imobilizados dentro de poucos minutos de exposição aos fungos, que produziram hifas em direção e através dos orifícios do corpo dos nematóides e foram conseqüentemente digerindo o conteúdo do corpo do parasita. Segundo Larsen e Nansen, estudos *in vitro* mostraram que o fungo *P. pulmonarius* exercia uma forte imobilização em larvas de nematóides em estágios pré-infectantes dos parasitas *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia oneophora*, *Oesophagostomum quadrispinulatum* e *Cyathostomum* spp. Alguns estágios larvais da mesma espécie demonstraram serem menos vulneráveis ao ataque por fungos, possivelmente porque elas estavam protegidas por sua cutícula externa (23).

### **Fungos Nematófagos**

Os fungos nematófagos são cosmopolitas e ocorrem em solos naturais, agricultáveis e em todos os tipos de matéria orgânica em decomposição. Podem ser isolados do solo de florestas, terras cultivadas, pastagens permanentes e temporárias, vegetação em decomposição, vegetação costeira, esterco, etc. No ambiente, esses fungos agem reciclando o carbono, nitrogênio e outros elementos que são originados a partir da degradação do nematóide (24).

Foram descritos vários antagonistas naturais como controladores biológicos de helmintos entre eles protozoários, bactérias, vírus, ácaros, besouros e fungos. Os fungos nematófagos, normalmente chamados de fungos destruidores de nematóides, estão catalogados em mais de 150 espécies e são os organismos antagonistas de nematóides mais pesquisados, pois têm mostrado serem capazes de reduzir efetivamente populações de nematóides em condições de laboratório e no campo (25). Estes fungos se apresentam como inimigos naturais de helmintos parasitos gastrintestinais, podendo ser encontrados nos ambientes mais distintos e atualmente têm demonstrando bons resultados como agentes de biocontrole (23).

Os fungos nematófagos são descritos como organismos imóveis e possuidores de parede celular bem semelhante à parede celular dos vegetais, principalmente quanto à composição química e estrutural. Eles podem coexistir no ambiente como um agente saprófita ou como um parasita. Por serem também parasitos obrigatórios, esses fungos podem se alimentar de uma variedade de helmintos de vida livre ou mesmo viverem sobre a matéria orgânica, nutrindo-se assim como saprófitas (9).

Segundo Barron, a maioria dos fungos nematófagos apresenta esporos denominados conídios (25). Estes surgem de estruturas de frutificação denominadas conidióforos e são essenciais na dispersão aérea dos conídios. Algumas espécies apresentam cachos de conídios em toda a estrutura do conidióforo, enquanto outras espécies produzem conidióforos com apenas um conídio em sua extremidade. Além do conídio, algumas espécies podem produzir a partir da hifa, uma estrutura conhecida como clamidósporo, um tipo de esporo de parede espessa e tamanho variado. Estes aparecem em condições de estresse extremo e podem dar origem a hifas, conidióforos e conídios.

Segundo Perry e Wright, a cutícula dos helmintos é de extrema importância, uma vez que desempenha ações específicas como: composição do esqueleto, que age como uma barreira protetora contra condições adversas do ambiente e participa dos processos de nutrição e excreção, desta forma, para qualquer processo infectante é essencial penetrar esta barreira (26). O mecanismo pelo qual o fungo penetraria a cutícula do verme ocorreria de forma parcialmente mecânica e enzimática (25). Apenas três principais categorias de proteínas têm sido identificadas como componentes da cutícula dos nematóides, as proteínas colágeno-like (requerem um agente redutor para solubilização), proteínas não colagenosas (insolúveis na presença de detergentes), e proteínas de superfície não colagenosas (solúveis na presença de agentes redutores) (27). Para Araújo, a fase inicial de penetração está associada com o reconhecimento mediado por uma interação lectina-carboidrato (28).

A sequência pela qual os fungos nematófagos infectam os nematóides envolve desde a adesão das estruturas de infecção na superfície do nematóide, à penetração da cutícula do nematóide, digestão de tecidos internos e translocação dos nutrientes para partes do micélio (28). Segundo Field e Webster, o processo de captura pelos fungos predadores inicia-se quando os nematóides são atraídos por substâncias orgânicas e inorgânicas como o CO<sub>2</sub> ou pela presença das armadilhas,

nos quais são apreendidos (29). Após o contato físico entre a superfície do nematóide e a armadilha, inicia-se o processo de adesão, que desencadeia uma série de eventos como: ativação de receptores lectínicos, que reconhecem os carboidratos, gerando a modificação de polímeros de superfície e secreção de enzimas específicas resultando em uma ligação firme entre o nematóide e o fungo, (30, 31), o que permite que o fungo penetre na cutícula formando um bulbo e inicie o desenvolvimento da hifa, que ocupa o corpo do nematóide gerando alterações de suas funções vitais e levando conseqüentemente à morte do parasita (15). Araújo sugere a participação de enzimas no processo de infecção uma vez que a atividade de proteases extracelulares (quimiotripsina e colagenase) tem sido detectadas, juntamente com fosfatases no ponto de contato entre o nematóide e os fungos nematófagos (32).

Segundo a estratégia utilizada para o antagonismo, sua morfologia e as características funcionais que estão associadas com a produção de estruturas especializadas para a captura de helmintos, os fungos podem ser classificados em quatro grupos: os ovicidas, que atuam em ovos, através da penetração da hifa na casca do ovo ou cutícula; os endoparasitas, que atuam em larvas e adultos através da ação de conídios adesivos; os predadores, que agem através da formação de estruturas ao longo das hifas especializadas em capturar os nematóides e ainda um quarto grupo conhecido como fungos produtores de metabólitos tóxicos, que embora pouco estudado também são classificados como fungos nematófagos (9).

### ***Fungos produtores de metabólitos tóxicos***

#### ***Enzimas***

A composição química da superfície do hospedeiro é de particular importância para as infecções e está relacionada com os tipos de enzimas hidrolíticas produzidas a partir de microorganismos envolvidos na etiologia destas infecções (33). A cutícula dos nematóides é constituída principalmente por proteínas como o colágeno, e a casca dos ovos dos nematóides é constituída por uma matriz proteica contendo quitina, sendo o complexo de quitina a principal barreira contra infecções fúngicas. Enzimas extracelulares capazes de digerir os principais constituintes químicos da cutícula do nematóide e da casca do ovo (proteínas,

quitina, e lípidos) foram isoladas e identificadas em vários fungos e bactérias nematófagos (35-37).

Segundo Yang et al., fungos nematófagos e bactérias podem atacar e matar nematoides por diversos processos, como a captura, parasitismo e a produção de toxinas e enzimas (38). Enzimas extracelulares, incluindo proteases de serina, quitinases e colagenases são importantes fatores de virulência que podem degradar os principais constituintes químicos da cutícula e da casca do ovo do nematóide. Os eventos críticos durante o processo de infecção dos nematóides pelos fungos nematófagos são: a penetração da cutícula, a imobilização do nematóide e invasão do fungo, com conseqüente digestão do parasita. As enzimas extracelulares desempenham um papel muito importante durante a infecção fúngica contra nematóides, uma vez que podem quebrar a integridade física e fisiológica da cutícula do nematóide, ajudando na penetração dos fungos e sua colonização (33, 39).

As serina-proteases são uma super família de enzimas que realizam um conjunto diversificado de funções fisiológicas e tem sido encontradas em bactérias e fungos como fatores patogênicos contra insetos, nematoides, e vertebrados (33, 39). Proteases de serina e quitinases desempenham papéis importantes durante a infecção de fungos nematófagos contra nematóides (39). A protease de serina P32 foi a primeira protease a ser identificada a partir dos ovos de nematóides predados pelo fungo *Pochonia rubescens* (35). Posteriormente cerca de 20 proteases foram identificados a partir de diferentes espécies de fungos nematófagos (39), como a protease VCP1 encontrada na espécie *Pochonia chlamydosporia* (40). Proteases de serina e quitinases podem degradar cutículas e cascas de ovos de nematoides. No entanto, o efeito tóxico de proteases e quitinases que hidrolisam proteínas sobre a cutícula ou quitinas sobre a casca do ovo depende geralmente de um meio adequado para fornecer as enzimas aos seus alvos (33, 39).

Estudos revelaram a evidência de produção extensiva de quitinases por fungos parasitas durante a infecção de ovos de nematóides, sendo importante fator na predação de nematóides, uma vez que a quitina é um polímero estrutural importante encontrado nas paredes celulares dos fungos, de exoesqueletos de invertebrados e também é um componente importante da camada média das cascas de ovos dos nematóides. O colágeno é o principal componente constitutivo da cutícula dos nematóides e as colagenases são enzimas capazes de catalisar a hidrólise do colágeno. Portanto, as colagenases provenientes de fungos

nematófagos podem desempenhar papéis importantes em infecções contra nematoides (41). Segundo Yang et al., ao longo dos últimos anos, foi identificado um número crescente de enzimas a partir de diferentes microorganismos nematocidas, e estas enzimas apresentaram grande potencial prático, especialmente como agentes de biocontrole (38).

### **Toxinas**

Segundo Kwok et al., em cultura de ágar, hifas aéreas de *Pleurotus* spp. produziram pequenas gotículas de toxina que foram identificadas como ácido trans-2-decenedioico (42). Os nematoides que entram em contato com a toxina foram paralisados e posteriormente invadidos pelas hifas. Este modo de ataque de nematoides foi observado em várias espécies de *Pleurotus* spp, como: *P. dryinus*, *P. euosmus*, *P. Eryngii*, entre outras. Putzke et al., cita a eficiência de isolados de *Pleurotus ostreatus* no controle do nematoide das galhas (43). Da mesma forma, Truong et al., citam que *Pleurotus ostreatus* e espécies relacionadas possuem células especializadas nas hifas capazes de produzir pequenas gotas de uma substância contendo toxinas. O nematoide ao entrar em contato com esta substância sofre uma reação de paralisia e lise da cutícula. Embora vivo, o nematoide permanece imóvel e os líquidos que extravasam de seus tecidos estimulam o crescimento de hifas do fungo em sua direção, em um processo de quimiotaxia. Essas hifas penetram, então, nos tecidos do nematoide digerindo-os e absorvendo os nutrientes liberados (44). Segundo Satou et al., *Pleurotus ostreatus* produz bolhas com atividade anti-nematoide. Estas bolhas promoveram a redução da “cabeça” do nematoide devido à liberação do ácido linoleico na solução. Além disso, estes autores observaram que o emprego de peróxido de hidrogênio foi o componente responsável pela atividade anti-nematoide do ácido linoleico (45). Devido às suas aplicações relevantes, o melhoramento genético tem recebido maior atenção. Uma forma de melhorar a patogenicidade dos fungos é aumentar o número de cópias de genes de virulência ou introduzir genes exógenos de virulência. Esta estratégia tem sido usada com sucesso em fungos nematófagos, entomopatogênicos e em outros fungos patogênicos (46).

### **Fungos ovicidas**

Os fungos ovicidas são denominados de oportunistas. Além de parasitarem ovos, cistos e fêmeas de fitonematóides e de helmintos, são saprofitos e, por essa razão, não dependem da presença do parasita no solo para a sua sobrevivência, sendo por isso facilmente cultivados em laboratório (9). Segundo Lopez-Llorca, o fungo ovicida forma uma grande rede de ramificações miceliais próxima dos ovos, porém, as cascas dos ovos são penetradas somente por algumas hifas sem que qualquer estrutura de penetração especializada seja produzida (47). Estes tipos de fungos colonizam o conteúdo do ovo, ou ainda a larva em desenvolvimento no seu interior. As hifas penetram a casca do ovo, através dos pequenos poros existentes na camada vitelínica, causando alterações na permeabilidade da casca. Durante a penetração, o complexo quitina-proteína da casca do ovo é danificado, provavelmente pela ação de enzimas. Ao passar pela camada vitelínica, a hifa aumenta de tamanho e atravessa a camada adjacente quitínica e lipídica. Posteriormente hifas endógenas emergem do ovo e produzem conidióforos, atuando como fonte de conídios (9).

Lysek em 1976, estabeleceu um método qualitativo para classificar a atividade ovicida, em 1991 esta classificação foi simplificada e estabelecida pelos seguintes parâmetros: efeito do tipo 1, efeito lítico sem prejuízo morfológico à casca e visualização das hifas aderidas à casca do ovo; efeito do tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, sem penetração das hifas através da casca; e efeito do tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, com penetração de hifas e colonização interna do ovo (48, 49). Uma mistura dos efeitos dos tipos 2 e 3 é observado na maioria dos casos, porém a classificação de um fungo como espécie ovicida somente acontece se este apresentar durante o processo de infecção dos ovos o efeito do tipo 3 (50). As espécies *Pochonia chlamydosporia* (syn. *Verticillium chlamydosporium* Goddard), *Paecilomyces lilacinus* e *Dactyella ovoparasitica* são as principais representantes com significativa atividade ovicida (49).

### **Fungos endoparasitas**

Segundo Mota et al., e Araújo et al., fungos endoparasitas não produzem micélio extenso, mas são capazes de infectar os nematóides através da produção de tubos de liberação de esporos, conidióforos ou conídios, que ingeridos desenvolvem

hifas responsáveis pela absorção do conteúdo interno do nematóide (5,9). Eles infectam o parasita por adesão à parede corporal ou por ingestão e se desenvolvem internamente nos nematóides após ação germinativa de esporos (25). Os fungos endoparasitas persistem principalmente como esporos, mas algumas vezes como clamidósporos (esporos resistentes) que são liberados no momento da desintegração do nematóide (9). Segundo Ribeiro, grande parte dos fungos endoparasitas é parasita obrigatório e por isso possuem um número pequeno de hospedeiros (51). Devido a esse fato tendem a terem mercados mais limitados e a serem onerosos quanto à sua produção em escala industrial, uma vez que a sua utilização e produção *in vitro* é menor. Apenas quatro espécies de fungos endoparasitas são cultivadas em laboratório: *Drechmeria coniospora*, *Hirssutella rhossiliensis*, *Nematoctonus concurrens* e *Nematoctonus haptocladus* (52). Além disso, não possuem capacidade de crescimento no solo, o que o torna impossível de ser proposto como inóculo para o controle ambiental do nematóide-alvo (51).

### **Fungos predadores**

A grande maioria dos fungos nematófagos está incluída dentro do grupo dos fungos predadores e é composto pela maioria das espécies. Produzem até seis tipos de armadilhas: (I) hifas adesivas não diferenciadas; (II) ramificações de hifas que sofrem anastomose, formando redes adesivas tridimensionais; (III) ramificações adesivas, que podem se unir formando redes adesivas simples bidimensionais; (IV) nódulos adesivos; (V) anéis constritores; (VI) e anéis não constritores. Entretanto, o tipo de armadilha mais encontrado em fungos predadores são as redes adesivas, nas quais a hifa é usada como armadilha e a presa é capturada por adesão. Há a penetração das hifas na cutícula do nematóide e dentro dele ocorre o crescimento das hifas e a digestão dos conteúdos internos (5). Além das hifas, os conídios podem germinar e dar origem diretamente às armadilhas (53). Segundo Barron, a substância adesiva presente nos fungos predadores que utilizam armadilhas aderentes, pode cobrir toda a hifa ou apenas as estruturas especializadas e/ou as redes (25). As estruturas de captura não aderentes são os anéis não constritores e os constritores. Os anéis não constritores são estruturas passivas nas quais os nematóides, ao penetrarem nesses anéis, enrolam-se e não conseguem sair. Os anéis constritores têm ação ativa, geralmente têm três células, e quando o nematóide penetra no anel, as células se expandem e esse intumescimento bloqueia

a abertura do anel, e o nematóide é, então, firmemente apreendido através de um estrangulamento que ocorre em menos de 0,1 segundos (54). Cooke propôs a divisão dos fungos predadores em 1963 de acordo com a velocidade de seu crescimento micelial. Dessa forma, os fungos de crescimento mais rápido formam armadilhas tipo redes tridimensionais. Os fungos de crescimento intermediário formam as armadilhas tipo nódulos; e aqueles com crescimento mais lento, formam anéis constritores. Fungos formadores de redes são reconhecidos como os mais competitivos em relação à microbiota do solo (5, 55). As armadilhas podem ser produzidas em resposta a múltiplos fatores como a motilidade; concentração, substâncias derivadas dos nematóides, escassez de água e ou nutrientes e o chamado ritmo endógeno, onde as hifas vegetativas, em crescimento, são ritmicamente predispostas para produção de picos de armadilhas. Além disso, algumas espécies são capazes de formar armadilhas espontaneamente (56).

As espécies de fungos predadores variam em sua capacidade de capturar os helmintos parasitos gastrintestinais. Eles são os organismos mais estudados e que apresentam maior potencial para serem comercializados, principalmente pelo seu maior isolamento e facilidade de cultivo em laboratório (57), além disso, possuem a vantagem de apresentar maior potencial de industrialização, uma vez que são os mais utilizados no controle biológico de nematóides que parasitam animais domésticos, reduzindo de forma efetiva a sua população tanto em condições laboratoriais quanto em condições a campo (58).

As espécies de predadores mais estudadas e utilizadas como controladores biológicos são os gêneros *Duddingtonia* e *Monacrosporium* (7, 59). As espécies *Duddingtonia* spp e *Monacrosporium* spp são produtores de redes tridimensionais e a forma de captura é realizada por um sistema de hifas vegetativas e por estruturas de captura. Essas estruturas de captura são produzidas graças a estímulos externos, como quantidade e presença dos nematóides, motilidade, produção de substâncias pelos nematóides, estresse fisiológico, e fatores biológicos como luminosidade, presença de água e estado nutricional do isolado fúngico, quando em cultivo em laboratório. Sabe-se que quanto maior a motilidade dos nematóides maior será a produção de armadilhas pelo fungo e que órgãos de captura podem ser produzidos em cultura pura, porém o processo de diferenciação das hifas em armadilhas ocorrerá dentro de 24 horas após a interação do fungo com o nematóide (9).



### **Controle Biológico**

Controle biológico pode ser definido como a utilização de antagonistas naturais disponíveis no ambiente que possam diminuir, a um limiar aceitável, determinada população de certo agente agressor que esteja causando perdas produtivas (57). Suas vantagens incluem, a fácil aplicação, boa dispersão ambiental, menor custo, efeito prolongado que poderá afetar populações subseqüentes de parasitas, diminuição do aparecimento de resistência e associação com outras drogas sem deixarem resíduos ou causar toxicidade tanto nos animais quanto no ambiente (60). As suas ações concentram-se sobre os hospedeiros intermediários, paratênicos, vetores e estágios larvais de vida livre, diminuindo a fonte de infecção para os hospedeiros finais, além disso, causam menos efeitos negativos no ambiente que os métodos químicos (57). Segundo Freitas et al., toda população é regulada por antagonistas, sejam eles o parasitismo, a predação, a competição e a antibiose, todos, mecanismos de controle biológico que ocorrem espontaneamente na natureza e independentes da interferência humana (60).

Os fungos nematófagos são comuns em solos naturais e em todo o tipo de material orgânico, porém, como necessitam de uma fonte primária de nutrição, sua atividade e quantidade no solo é variável (61). Logo, o sucesso para o estabelecimento desses fungos no solo dependerá basicamente de uma fonte alimentar que possa lhes garantir vantagens competitivas na microbiota existente (62).

Segundo Pearsson, a habilidade dos fungos nematófagos em colonizar a rizosfera (região na qual o solo e as raízes das plantas entram em contato) tem sido apontada como uma característica importante de um agente de biocontrole (63). Para que um fungo seja efetivo como controlador biológico, deverá estar presente e ativo nas fezes, no solo e no ambiente ao mesmo tempo que as formas pré-parasitárias (64). Por isso, é necessária uma seleção de fungos nematófagos que possam atravessar o trato gastrointestinal dos animais, mantendo suas qualidades de crescimento e predação nos ovos e nas fases pré-parasitárias nas fezes (57). Segundo Juniper, parte do insucesso de seu emprego pode ser atribuído a alguns fatores, como a baixa competitividade com fungos saprófitas no ambiente e a pequena produção de armadilhas (65).

Uma característica importante na utilização do biocontrole é a resistência à passagem pelo trato digestivo dos animais. Uma vez oferecido o fungo por via oral, e após sua passagem pelo trato digestivo, ele se desenvolveria nas fezes

juntamente com as larvas, podendo, então, levar a uma redução do número de larvas a partir do bolo fecal (66). Segundo Araújo et al., a resistência à passagem pelo trato gastrointestinal é uma característica importante em fungos nematófagos, quando se deseja o desenvolvimento de formulações de uso oral que permitam o controle de L<sub>3</sub> no ambiente (59). A maioria dos estudos sobre o controle biológico das helmintoses têm envolvido apenas utilização de fungos nematófagos predadores de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de helmintos parasitos gastrintestinais (67).

Segundo Braga et al., o controle biológico sobre ovos de helmintos é uma alternativa muito promissora e que vem se destacando atualmente (68). Em 1986, Jatala sugeriu que o efeito da ação predatória dos fungos endoparasitas sobre uma população de helmintos é menor quando comparada com a mesma ação predatória de fungos parasitas de ovos. A maior parte da população de helmintos encontrados no ambiente está sob a forma de ovos e estágio juvenil e não como adulto, o que favorece a ação predatória desses fungos ovicidas (69). Os fungos que impedem a evolução de ovos provavelmente são mais promissores como agentes de biocontrole, pois quando comparados aos fungos predadores de endoparasitas, seu efeito na redução de uma população de helmintos será bem mais acentuado (68). Segundo Kerry, algumas espécies ovicidas produzem clamidósporos e, portanto, poderiam ser empregados no controle das populações de helmintos parasitos gastrintestinais (69).

A resistência adquirida às classes químicas de anti-helmínticos é atualmente um dos problemas mais graves enfrentados no tratamento das infecções helmínticas (70). O controle das helmintoses gastrintestinais dos animais domésticos é feito principalmente por meio da utilização de anti-helmínticos, que agem sobre as formas parasitárias pré-estabelecidas no hospedeiro, porém, este método apresenta algumas desvantagens. A seleção de um agente que possa ser empregado comercialmente como controlador biológico de parasitos gastrintestinais é uma proposta viável que se baseia na capacidade de produção do antagonista em escala industrial, nos custos relacionados a esta produção, na competitividade com as drogas tradicionais estabelecidas no mercado e no tempo de sobrevivência do organismo em formulações comerciais, atentando-se para o fato que as formulações ofereçam segurança para os produtores, consumidores, animais tratados e ao meio ambiente. A administração de fungos nematófagos aos animais domésticos é considerada uma proposta promissora, pois o emprego deles tem se apresentado como uma boa oportunidade de controle dos estágios de vida livre dos nematóides

nas pastagens, reduzindo em grande parte as reinfestações e contribuindo para a sua profilaxia. Os problemas relacionados à resistência e ecotoxicidade demonstram a necessidade da implantação de programas integrados de controle parasitário, que tenham o objetivo de assegurar a saúde dos organismos vivos e ambientes menos contaminados (5, 71).

### ***Pleurotus spp***

Os fungos pertencentes ao gênero *Pleurotus* apresentam distribuição mundial, podem ser encontrados naturalmente em madeira morta e em decomposição e também em cultivos destinados ao consumo humano (23). Os primeiros a demonstrar que os fungos pertencentes a este gênero têm a capacidade de atacar e consumir nematóides de vida livre no solo, foram Thorn e Barron em 1984 (12). Eles observaram que os nematóides ficaram imobilizados dentro de poucos minutos de exposição ao fungo e que as hifas dos fungos crescem em direção e através dos orifícios do corpo dos nematóides e que o conteúdo do corpo é digerido. Em 1987, Barron e Thorn, descreveram que quando o fungo entra em contato com o nematóide, ele o imobiliza por meio de gotículas de líquido produzido pelas células secretoras encontradas ao longo das hifas (72). Saikawa e Wada, sugeriram que *P. ostreatus* também possuía botões adesivos que tem a função de capturar os nematóides de vida livre para que posteriormente eles sejam atacados pelas hifas acessórias que penetram nos orifícios do corpo (73).

Segundo Saikawa e Wada e Barron e Thorn, o efeito nematicida de *Pleurotus spp* tem pouco ou nenhum efeito discriminativo sobre diferentes espécies de nematóides (72, 73). Igualmente, Larsen e Nansen, demonstraram que o *Pleurotus pulmonarius* exerce um efeito de imobilização nas larvas de nematóides de quatro espécies de animais diferentes (23). O efeito protetor da cutícula externa dos nemátoides foi observado em diferentes estudos, nos quais demonstrou-se que as larvas preinfectantes são muito mais vulneráveis aos efeitos do fungo do que as larvas infectantes, e que se a cutícula externa das larvas infectantes é removida antes da exposição fúngica, os nemátodos são facilmente atacados pelo fungo. Acredita-se que o efeito de imobilizar os nematóides pode ser reversível, uma vez que pelo menos um estágio larval (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>) recuperou sua motilidade depois de ter sido extraída do substrato que continha o fungo (23). Segundo Thorn e Barron,

alguns dos nemátoides inativados, quando em contato com o fungo, podem mover-se livremente, se removidos do fungo e colocados numa gota de água (12).

O fungo *P. ostreatus*, também chamado de cogumelo ostra pode degradar resíduos vegetais e tem sido utilizado extensivamente para degradar os materiais celulósicos de fontes agroindustriais. Por mais de 30 anos este fungo foi cultivado comercialmente utilizando diferentes resíduos agroindustriais, com uma produção mundial de 4830 toneladas/ano (74). Esta prática é uma relação custo-benefício alternativa para reutilizar os milhões de toneladas de resíduos de agronegócios gerados a nível mundial, e é também um recurso em potencial para produção no setor alimentício. O crescimento de *Pleurotus ostreatus* pode ser alcançado em sistemas domésticos porque ele não requer instalações sofisticadas ou controle rigoroso das condições ambientais. A produtividade é elevada e permite redução do volume de resíduos que devem ser eliminados (75).

Existem muitos nemátoides prejudiciais, incluindo nemátoides parasitas de plantas e animais. O *Pleurotus ostreatus* é um cogumelo famoso que oprime nematóides vivos (45). O fenômeno foi descrito pela primeira vez por Thorn e Barron, e desde aquela época, surgem pesquisas que avaliam a predação dos nematóides por estes cogumelos. O *Pleurotus ostreatus* é capaz de produzir pequenos botões esféricos que contêm o chamado Nematotoxin. Quando os nematóides entram em contacto com o Nematotoxin, eles ficam imobilizados em apenas alguns minutos. Ao entrar em contato com essa toxina, a região da cabeça do nematóide encolhe consideravelmente em tamanho, e o esófago é deslocado (12). Foi anteriormente relatado que uma das substâncias produzidas pelo *Pleurotus ostreatus* é o ostreatin (ou ácido decenedioico) No entanto, detalhes sobre o mecanismo de ação para esta forma de predação é ainda desconhecido (42).

Satou em 2008, isolou um único composto proveniente de isolados fungicos de *Pleurotus ostreatus* a partir de uma fração que foi separada durante a retração da cabeça do nematóide e que por meio de uma análise por espectroscopia determinaram que a substância era o ácido linoleico. Ainda analisando a atividade anti-nematóide do fungo por meio da retração da cabeça do nematóide foi realizado um teste, utilizando um composto de ácido linoleico padrão, porém não foi observado efeito imediato. No entanto quando utilizou-se uma solução de ácido linoleico que tinham sido preservada por vários dias, houve um efeito imediato notável, sugerindo que o peróxido de ácido linoleico foi responsável pela atividade anti-nematóide de retração da cabeça do nematóide (45). Segundo Porter, o ácido

linoleico é um composto que pode facilmente causar oxidação (76). Esta informação foi corroborada por um estudo realizado por Satou em 2008, no qual comparou a atividade anti-nematóide do peróxido de hidrogênio com a do peróxido de ácido linoleico e observou que as reduções no tamanho da cabeça causadas pelo peróxido de hidrogênio e ácido linoléico foram muito semelhantes, sugerindo que o peróxido de ácido linoleico desempenha um papel importante na atividade anti-nematóide do *P. ostreatus*. Acredita-se que a reação anti-nematóide ocorre não só devido ao envolvimento de ácido linoleico, mas também pode ocorrer devido à participação de outros ácidos graxos insaturados (45). Segundo Satou em 2008, os botões esféricos de *P. ostreatus*, quebram quando entram em contato com um nematóide liberando o ácido linoleico. Subsequentemente, a auto-oxidação converte o ácido linoleico em peróxido de ácido linoleico, o qual, em seguida, paralisa os nematóides (45). Supondo-se que *P. ostreatus* contém muitos outros ácidos graxos insaturados, além de ácido linoleico, é possível que outros ácidos graxos insaturados possam ser convertido em peróxidos (77). Os radicais livres de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, são altamente reativos e se decompõem rapidamente, o que permite o *P. ostreatus* ter um elevado grau de controle sobre os radicais de oxigênio tornando a sua utilização eficaz na inativação dos nemátodos (45).

Segundo Ohga e Royse, o *Pleurotus eryngii*, conhecido como cogumelo ostra rei, é um dos cogumelos comercialmente mais importantes na Coreia. O *P. eryngii* foi originalmente cultivado no norte da Itália e Suíça, onde é conhecido localmente como cardoncello, mas agora é comumente cultivado na Europa, Oriente Médio e América do Norte, bem como em partes da Ásia (78). O cultivo de *P. eryngii* em escala industrial começou na Coreia em 1996, e até 2011, a sua produção era estimada em 54.820 toneladas. Os fungos do gênero *Pleurotus* são basidiomicetos de interesse comercial e biotecnológico, devido ao seu sabor refinado, sua capacidade de produzir biocompostos antitumorais e hipocolesterolêmicos, além de sua habilidade decompositora de inúmeros resíduos vegetais (79). Os fungos basidiomicetos, além de sua ampla utilização na alimentação humana e de suas propriedades medicinais, são considerados os fungos com maior capacidade de degradação de fibras vegetais e, portanto, com grande potencial de utilização em processos biotecnológicos na degradação de fibras lignocelulósicas. *Pleurotus eryngii* é um dos cogumelos que vem se tornando popular devido as suas propriedades nutricionais e medicinais. Estes basidiomicetos têm recebido grande

destaque devido, principalmente, a presença de carboidratos que atuam como modificadores de resposta biológica. O genero *Pleurotus* compreende um grupo diversificado de espécies de cogumelos cultivados com altos valores nutricionais, propriedades farmacológicas significativas e componentes com propriedades medicinais, incluindo, antiviral, antitumoral, antibacteriano, anticolesterolêmicos e efeitos imunoestimuladores, foram isolados a partir de várias espécies *Pleurotus* (80).

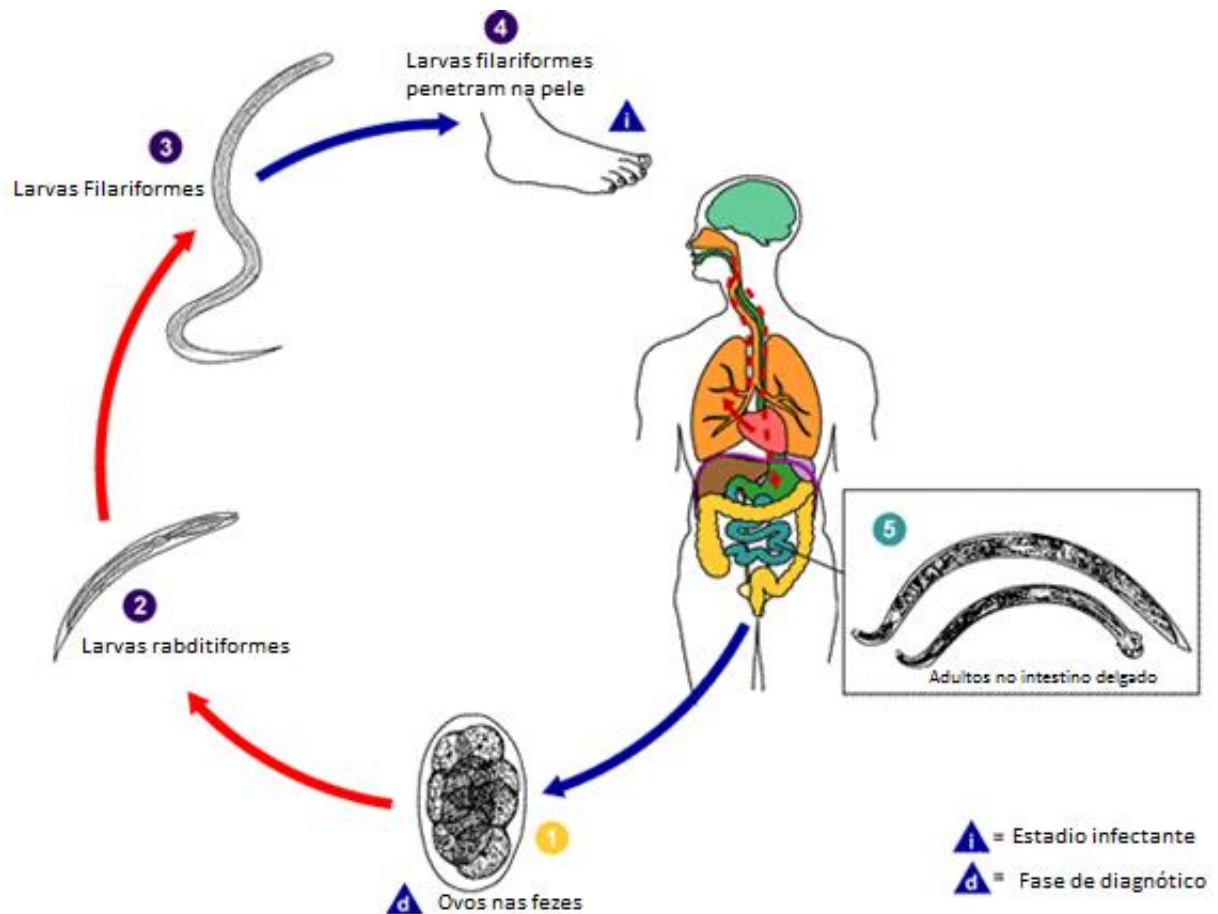
### **Ancilostomídeos**

Ancilostomídeos são um dos nematóides parasitas mais comuns que infectam mamíferos, incluindo os seres humanos, cães, gatos e canídeos silvestres (3). São prevalentes em regiões temperadas e tropicais do mundo e mais de 100 espécies pertencentes a 18 gêneros de ancilostomídeos foram descobertos, parasitando o trato intestinal de animais carnívoros e herbívoros. Os ancilostomídeos humanos incluem as espécies de nematóides, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*. Um grupo maior de ancilostomídeos, que infectam os animais, podem parasitar os seres humanos (*A. ceylanicum*) ou podem penetrar na pele humana, causando larva migrans cutânea (*A. braziliense*, *A. caninum*, *Uncinaria stenocephala*), porém estes não se desenvolvem além disso. Ocasionalmente larvas de *A. caninum* podem migrar para o intestino humano, causando enterite eosinofílica e também têm sido considerados como causadores de neuroretinite subaguda unilateral difusa (81).

Pertencentes a família Ancylostomatidae, o *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale* são as duas espécies de ancilostomídeos mais comumente encontradas em seres humanos (82). O *Ancylostoma ceylanicum* é a única espécie de tênias de caninos e felinos que podem se desenvolver em forma adulta no trato intestinal humano, sendo considerado zoonose em algumas regiões da Ásia e do Sudeste Asiático (83). Ngui et al., forneceram evidências epidemiológicas e moleculares de que a infecção de *A. ceylanicum* em seres humanos e animais que vivem na mesma área endêmica tinham uma forte correlação, o que apoiou a transmissão de *A. ceylanicum* entre humanos e animais domésticos (cães e gatos) (84). Segundo Liu et al., os resultados da análise filogenética, revelou a afinidade na evolução genética de *A. ceylanicum*, implicando no risco zoonótico entre animais (gatos, cães) e os seres humanos. Assim, devido à capacidade de *A. ceylanicum* em

causar infecção patente em humanos, o risco zoonótico dos reservatórios, cão e gato, para comunidades nas regiões tropicais deve ser determinada (81).

Quando ancilostomídeos parasitam humanos o ciclo biológico (Figura 1) inicia-se quando os ovos são eliminados nas fezes, e em condições favoráveis (umidade, calor, sombra), as larvas eclodem em 1 a 2 dias. As larvas rhabditiformes crescem nas fezes e/ou no solo e depois de 5 a 10 dias (e duas mudas) eles se tornam filariformes e infectantes (terceira fase). Estas larvas infectantes (L<sub>3</sub>) podem sobreviver 3 a 4 semanas em condições ambientais favoráveis. Em contato com o hospedeiro humano, as larvas penetram na pele e são transportadas por meio dos vasos sanguíneos ao coração e, em seguida, para os pulmões. Elas penetram nos alvéolos pulmonares, migram pela árvore brônquica para a faringe, e são deglutidas. As larvas atingem o intestino delgado, onde residem e se desenvolvem até o estágio adulto. Os vermes adultos vivem no lúmen do intestino delgado, onde se fixam à parede intestinal e provocam a perda de sangue. A maioria dos vermes adultos são eliminados em 1 a 2 anos, mas a longevidade pode atingir vários anos. Algumas larvas de *A. duodenale*, após a penetração da pele do hospedeiro, podem tornar-se dormentes (no intestino ou no músculo). Além disso, a infecção por *A. duodenale* pode provavelmente ocorrer também por via oral e transmamária. O *N. americanus*, no entanto, requer uma fase de migração transpulmonar (85).



**Figura 1:** Ciclo biológico de infecção por Ancilostomídeos em humanos. Adaptada de <http://www.cdc.gov/dpdx/hookworm/>.

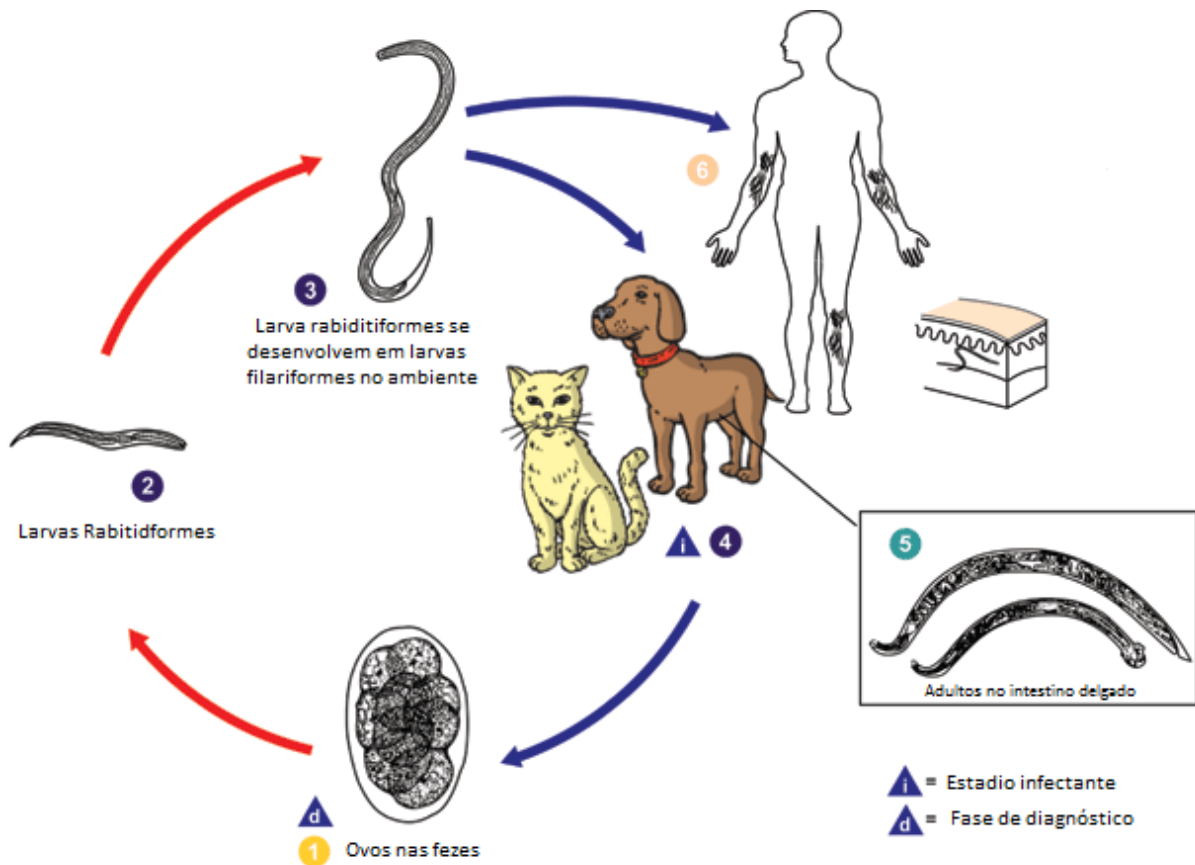
O *Ancylostoma caninum* e o *Ancylostoma braziliense*, são geohelmintos intestinais de cães e gatos e têm requerido grande atenção devido ao seu potencial zoonótico por meio direto da contaminação do solo com as fezes de animais parasitados (4). Crompton e Santarém et al., estimam que mais de 1 bilhão de pessoas no mundo são infectadas por meio do solo por geo-helmintos, sugerindo, portanto que a contaminação ambiental é um importante indicador do risco da população humana de contrair estas infecções. A presença de cães infectados em locais públicos pode aumentar significativamente a transmissão deste nematóide, que ocorre pela contaminação do solo com os ovos que podem misturar-se e permanecer viáveis por dias (86, 87). Áreas públicas, como os parques e praças, são os principais locais de contaminação por ancilostomatídeos em crianças com idade pré-escolar (4). Em estudo realizado em Belo Horizonte, foi verificada prevalência de 76% de *A. caninum* e 1,66 % de *A. braziliense* em filhotes de cães (88).



*Ancylostoma* spp de cães e gatos são parasitas de grande relevância veterinária e de saúde pública. Porém, um estudo realizado no sudeste do Brasil, revelou que a maioria dos proprietários de cães desconhecem as espécies de parasitas intestinais de cães, os mecanismos de transmissão, os fatores de risco como zoonoses e as medidas profiláticas específicas. Altos níveis de contaminação ambiental com ovos de *Ancylostoma* spp em parques e praças públicas têm sido relatados em diferentes regiões do Brasil (89). Nos humanos, o *A. braziliense* e o *A. caninum* são responsáveis pela patologia denominada larva migrans cutânea, doença caracterizada por erupções lineares serpiginosas progressivas que se prolongam pelo tecido subcutâneo. Doença causada pela migração das larvas de terceiro estágio (L<sub>3</sub>) destes vermes, que permanecem no solo durante semanas ou meses (90). Segundo Prociv e Croese, têm sido observados crescentes casos de crianças com enterite eosinofílica associada à infecção intestinal por *A. Caninum* (91).

A larva migrans cutânea é uma infecção zoonótica causada por espécies de ancilostomíases que não usam os humanos como um hospedeiro definitivo. Os hospedeiros definitivos para estas espécies de parasitos são cães e gatos. O ciclo no hospedeiro definitivo (Figura 2) é muito semelhante ao ciclo para a espécie humana. Os ovos são eliminados nas fezes, e em condições favoráveis (umidade, calor, sombra), as larvas eclodem em 1 a 2 dias. As larvas rhabditiformes crescem nas fezes e/ou solo e depois de 5 a 10 dias (e duas mudas) elas se tornam filariformes (terceira fase), tornando-se larvas infectantes (L<sub>3</sub>). Estas larvas infectantes podem sobreviver 3 a 4 semanas em condições ambientais favoráveis. Em contato com o animal hospedeiro as larvas penetram na pele e migram através dos vasos sanguíneos do coração e, em seguida, para os pulmões. Elas penetram nos alvéolos pulmonares, migram pela árvore brônquica para a faringe, e são deglutidas. As larvas atingem o intestino delgado, onde residem e amadurecem até a fase adulta. Os vermes adultos vivem no lúmen do intestino delgado, onde se fixam à parede intestinal e é o local onde são postos os ovos e posteriormente eliminados para o meio exterior com as fezes. Os cães e gatos podem se infectar pelas vias oral, percutânea, transplacentária e transmamária. Algumas larvas ficam presas nos tecidos, e servem como fonte de infecção para os filhotes através da transmissão transmamária (e possivelmente transplacentária). Os seres humanos também podem ser infectados quando as larvas filariformes penetram na pele, porém essas larvas não podem amadurecer no hospedeiro humano, restringindo-se

à epiderme, local em que pode migrar vários centímetros por dia. Algumas larvas podem persistir no tecido mais profundo depois de terminar a sua migração pela pele (85).



**Figura 2:** Ciclo biológico de infecção por Ancilostomídeos em cães e gatos. Adaptada de <http://www.cdc.gov/dpdx/hookworm/>.

As larvas destes parasitas migram pelo parênquima pulmonar de cães e gatos que, em geral, são assintomáticos (92). Nos cães e nos gatos, estes parasitas gastrintestinais podem causar anemia, diarreia, perda de peso, enterite hemorrágica e depressão (93). Nas infecções maciças, podem ocorrer lesões e reação inflamatória do parênquima pulmonar em resposta à migração das larvas, sendo mais comum em filhotes nos quais podem ser observadas tosse e taquipnéia. Pode ocorrer, nestes casos, infecção bacteriana secundária, exigindo tratamento com antibiótico. Entretanto, a principal patogenia dos ancilostomídeos nos cães e gatos ocorre pela espoliação sanguínea. Úlceras na mucosa intestinal são associadas à fixação das formas adultas pela sua peça bucal. Um adulto de *A. caninum* pode sugar até 0,8mL de sangue ao dia e, em média, a perda de sangue por dia decorrente de hemorragia da mucosa intestinal e ingestão de sangue pelo parasita, é de 0,1 a 0,2mL (92). Normalmente os parasitas não utilizam a mucosa intestinal

como alimento. Porém, quando os animais desenvolvem alguma resistência, os hábitos do parasita se modificam e, no lugar de sangue, utilizam a mucosa. O quadro é mais severo em cães jovens e caracteriza-se por diarreia sanguinolenta e anemia. Os animais parasitados emagrecem, ficam anoréticos e podem ficar desidratados, deprimidos e menos ativos, podendo levar a morte de alguns cães (94).

## OBJETIVO

### **Objetivo Geral**

Avaliar a eficiência de isolados fúngicos de *Pleorotus eryngii* no controle *in vitro* de larvas de *Ancylostoma caninum* de cães.

### **Objetivo Específico**

- Avaliar a interação do fungo *P. eryngii* sob larvas L<sub>3</sub> de *A. caninum*.
- Avaliar a produção das gotículas pelo fungo *P. eryngii*.
- Avaliar a redução do número de larvas de *A. caninum* após a ação do fungo *P. eryngii*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Obtenção dos isolados fúngicos**

Foi utilizado o fungo nematófago *P. eryngii* (PLE 06). Estes isolados foram provenientes do laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

### **Obtenção dos conídios**

Discos de cultura de 4 mm de diâmetro foram extraídos de isolados fúngicos mantidos em tubos de ensaio contendo corn-meal-ágar 2% (CMA 2%) e transferidos para placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro contendo 20mL de batata-dextrose-ágar 2%, mantidos a 25°C no escuro durante 10 dias. Após o crescimento dos isolados, novos discos de cultura de 4mm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri de 9,0cm diâmetro contendo 20mL de agar-água 2% (AA 2%) onde foram acrescidos de 1mL de água destilada contendo 1.000 larvas de *Panagrellus* sp., diariamente durante um período de 21 dias para indução de formação de conídios fúngicos. Quando se observou o completo desenvolvimento fúngico, 5mL de água destilada foram adicionados à cada placa de Petri, sendo que os conídios e fragmentos miceliais foram removidos segundo a técnica descrita por Araújo et al. (19).

### **Obtenção de larvas de *Ancylostoma caninum***

Fezes frescas foram obtidas de cães residentes no Estado do Espírito Santo. A partir destas amostras fecais foi retirado cerca de 3-5g de fezes para a realização da técnica de Willis-Mollay (flutuação), com intuito de identificarmos os ovos presentes nas amostras. Esta técnica consiste em misturar as fezes com 20mL de solução hipersaturada ou saturada de cloreto de sódio, posteriormente filtrar a suspensão de fezes através de um tamis pra outro recipiente e a partir deste colocar a suspensão filtrada em um copo de borrel e se necessário completar com solução de NaCl. Colocar uma lamínula sobre o copo de borrel e deixar em repouso por 15 minutos. Quando removemos a lamínula ela traz uma gota pendente que deve ser colocada sobre uma lâmina de micorscópico para a posterior identificação dos ovos no microscópio.

Após a identificação de ovos de *Ancylostoma caninum*, foram confeccionadas coproculturas com aproximadamente 20 g de fezes e estas foram incubadas em câmara de incubação BOD por um intervalo de 7 dias. Após esse período por meio da técnica de Baermann as larvas foram extraídas e identificadas.

### **Ensaio experimental**

Foi realizado um ensaio experimental *in vitro*. No experimento foi avaliada a atividade larvicida do fungo *P. eryngii* sobre larvas L<sub>3</sub> de *A. caninum* e grupo controle (sem fungo).

Foram confeccionadas 30 placas de Petri de 9,0cm de diâmetro contendo 20mL de AA 1%, quinze placas do grupo tratado e quinze placas do grupo controle. No grupo tratado, em cada placa de Petri foi colocado 30µl da solução que continha as larvas e que equivalia a 1000 larvas de *A. caninum* e 50µl do isolado fúngico. No grupo controle (sem fungos) foi colocada somente as 1000 larvas.

Durante sete dias, a cada 24 horas, 10 campos aleatórios de 4mm de diâmetro em cada placa do grupo tratado e controle foram observados em microscópio de luz em objetiva de 10x, contando-se o número de larvas em cada um. Ao final de sete dias, foram recuperadas as larvas não predadas do conteúdo das placas de Petri através do aparelho de Baermann com água a 42°C (95).

### **Análise estatística**

A média de larvas de *A. caninum* recuperadas foi calculada. Os dados foram interpretados estatisticamente pela análise de variância em níveis de significância de 1 e 5% de probabilidade (96). A eficiência de predação das larvas em relação ao controle foi avaliada pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. Posteriormente, o percentual de redução da média de L<sub>3</sub> foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{Redução} = \frac{(\text{Média de L3 recuperadas do controle} - \text{Médias de L3 recuperadas do tratamento}) \times 100}{\text{Média de L 3 recuperadas do controle}}$$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O controle biológico por meio da utilização de fungos nematófagos tem potencial para se tornar uma importante estratégia de controle dos helmintos gastrintestinais em animais domésticos. Larsen e Nansen, Barron e Thorn, Saikawa e Wada, demonstraram que o fungo *Pleurotus* spp tem atividade nematicida, podendo ser considerado um fungo nematófago. Embora existam trabalhos que demonstrem a ação do fungo *Pleurotus* spp como um fungo predador de larvas de nematóides, não existe nenhum trabalho demonstrando sua ação sobre larvas do gênero *Ancylostoma* (23, 72, 73).

Nesse trabalho foi comprovada a ação nematicida do fungo *P. eryngii* sobre larvas de *A. caninum*, verificando-se que o isolado fungico foi capaz de interagir e preda as larvas durante o experimento. A média de L<sub>3</sub> recuperadas do grupo controle foram significativamente maiores do que a média do grupo tratamento. O isolado fúngico de *P. eryngii* reduziu o número médio de larvas de *A. caninum* em relação ao controle ( $p < 0,01$ ) e apresentou um percentual de redução de 47,56%. O número médio de larvas recuperadas no grupo tratado foi de 32,2 ( $\pm 15,3$ ) e do grupo controle foi 72,88 ( $\pm 27,0$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Eficiência do isolado fúngico de *Pleurotus eryngii* na redução do número de larvas L<sub>3</sub> de *Ancylostoma caninum*. Comparação entre as linhas, das médias seguidas do percentual de redução.

|          | Média ( $\pm$ SD)     | % Redução |
|----------|-----------------------|-----------|
| Tratado  | 32,2 ( $\pm 15,3$ )*  | 47,56%    |
| Controle | 72,88 ( $\pm 27,0$ )* |           |

\* Diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,01$ ).

Estudo semelhante com larvas de *Ancylostoma* spp realizado por Maciel et al., encontrou valores de percentual de redução de 88,76% (*Arthrobotrys robusta*), 97,75% (*Duddingtonia flagrans*) e 89,89% (*Monacorsporium thaumasium*) para os diferentes isolados fungicos utilizados, que foram capazes de preda a L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp nos ensaios *in vitro* encontrando valores menores no final do experimento, o que comprova a predação pelo fungo (97). Fernandes et al., avaliou a atividade predatória do fungo *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Ancylostoma ceylanicum* após o trânsito gastrintestinal em hamsters e encontrou ao

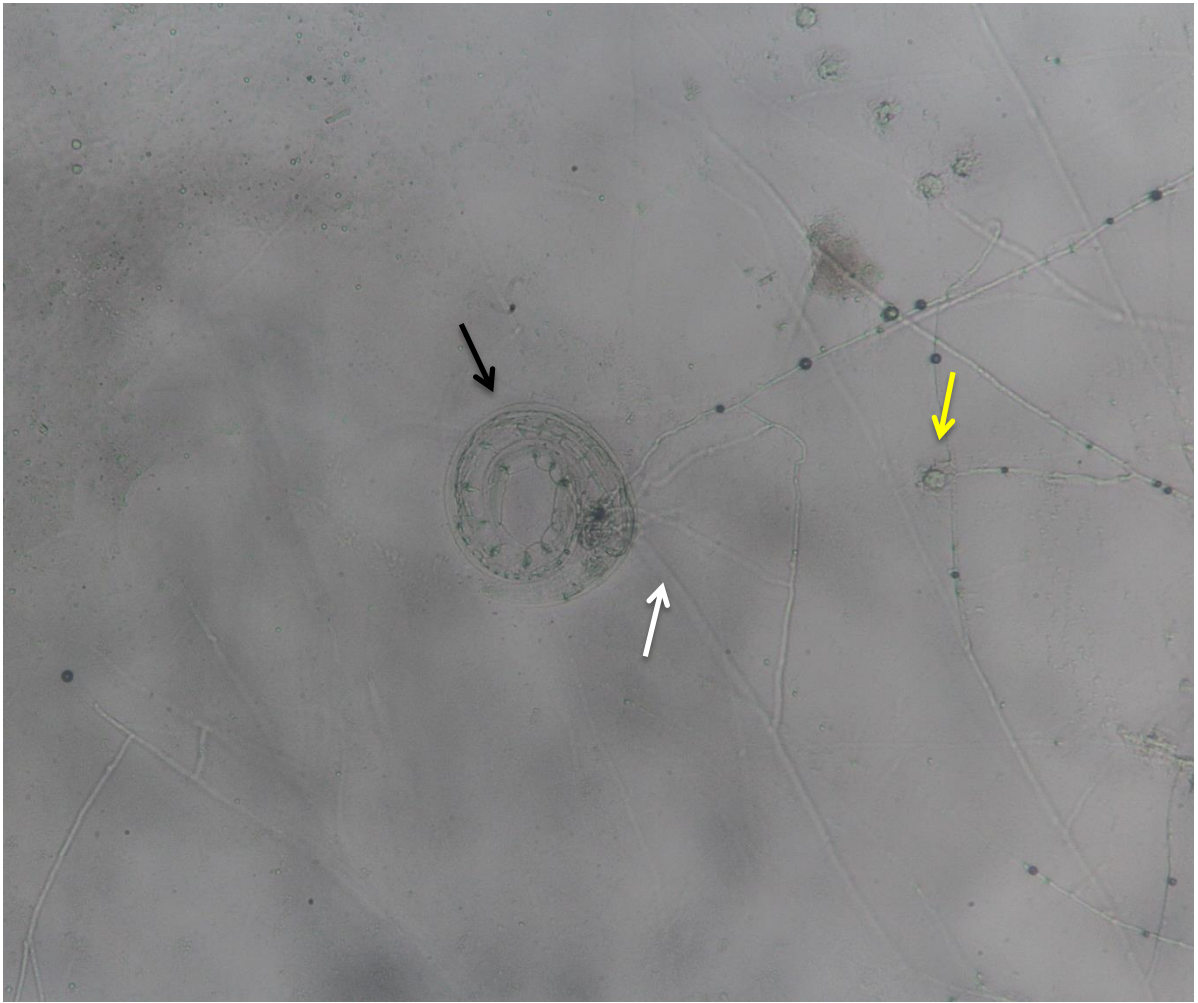
longo dos horários estudados, valores de percentual de redução de: 43,2% (6 horas); 30,8% (8 horas); 25,8% (12 horas); 30% (24 horas) e 11% (36 horas) (98).

Fungos decompositores de madeira possuem a capacidade de capturar, matar e digerir nematoides. Onze espécies de fungos pertencentes à ordem Agaricales, incluindo *P. ostreatus*, tem a capacidade de matar nematoides de galhas (12), reduzir a formação de cistos do nematoide *Heterodera schachtii* e reduzir o número de nematoides de galhas e de massas de ovos de *Meloidogyne incognita* (13, 99).

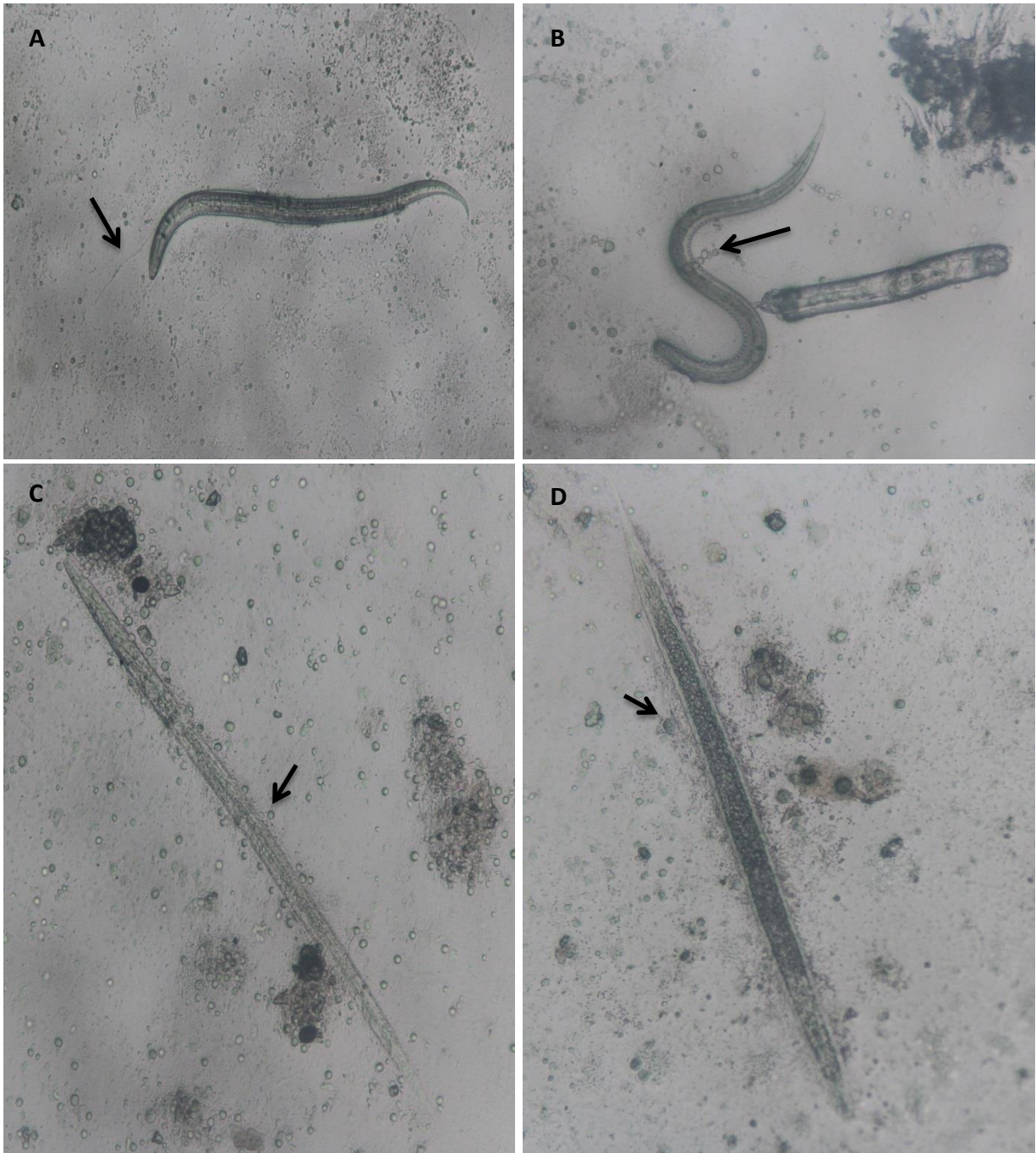
A eficiência de isolados de *P. ostreatus* no controle do nematoide das galhas foi citado por Putzke et al. (43). Da mesma forma, Truong et al., citaram que *P. ostreatus* e espécies relacionadas possuem células especializadas nas hifas capazes de produzir pequenas gotas de uma substância contendo toxinas (44). O nematoide ao entrar em contato com esta substância sofre uma reação de paralisia e lise da cutícula. Embora vivo, o nematoide permanece imóvel e os líquidos que extravasam de seus tecidos estimulam o crescimento de hifas do fungo em sua direção, em um processo de quimiotaxia. Essas hifas penetram, então, nos tecidos do nematoide digerindo-os e absorvendo os nutrientes liberados. Satou et al., observaram que *P. ostreatus* produz bolhas com atividade anti-nematoide. Estas bolhas promoveram a redução da “cabeça” do nematoide devido à liberação do ácido linoleico na solução (45).

Com auxílio de microscópio óptico observou-se nesse experimento que as larvas L<sub>3</sub> de *A. caninum* sofreram ação do isolado fungico *P. eryngii*. Foi possível visualizar a presença de pequenas hifas e gotículas/bolhas na periferia e no interior das larvas e que a quantidade dessas gotículas aumentava no interior das larvas ao longo dos 7 dias (Figura 3-6).

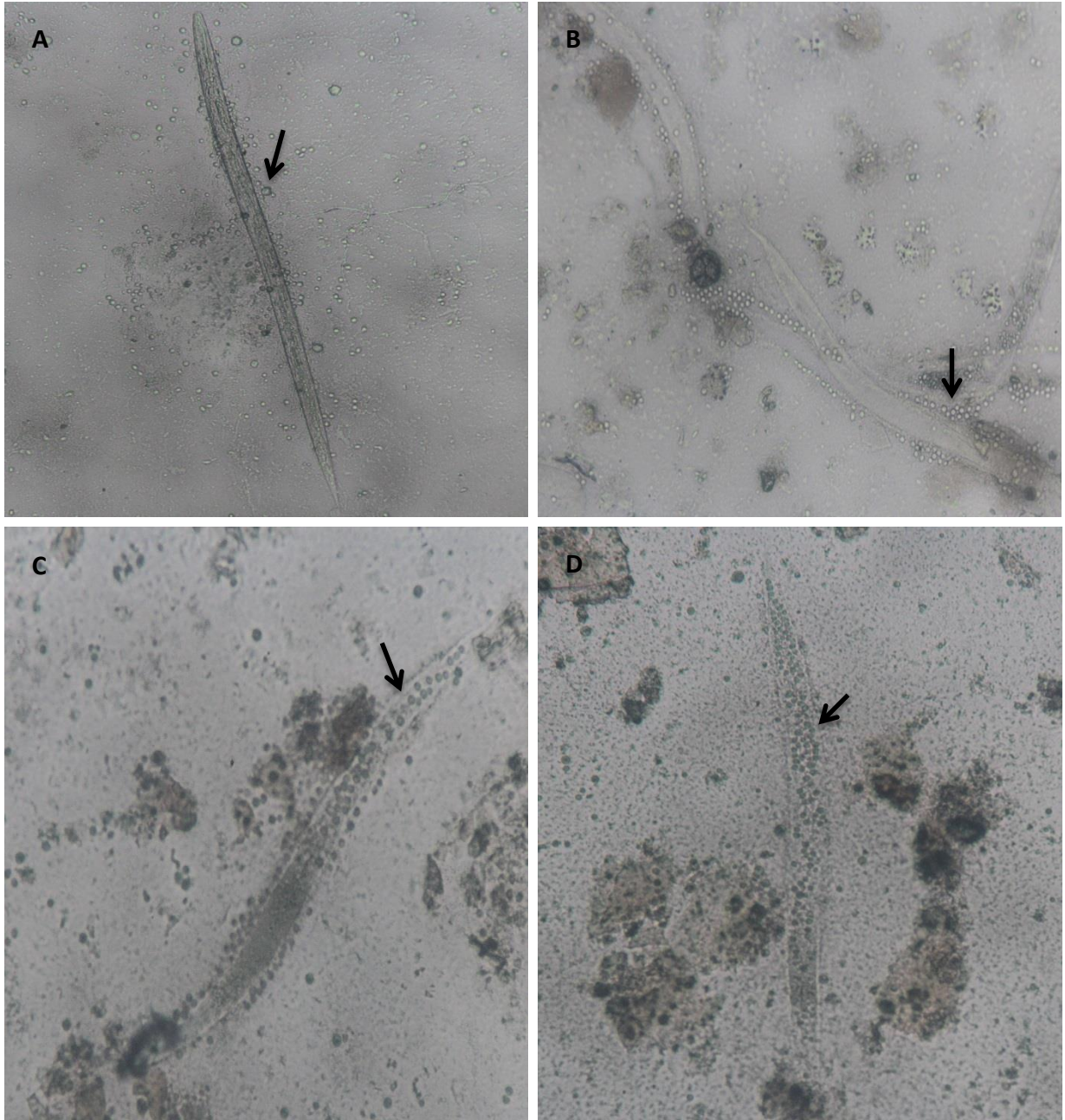




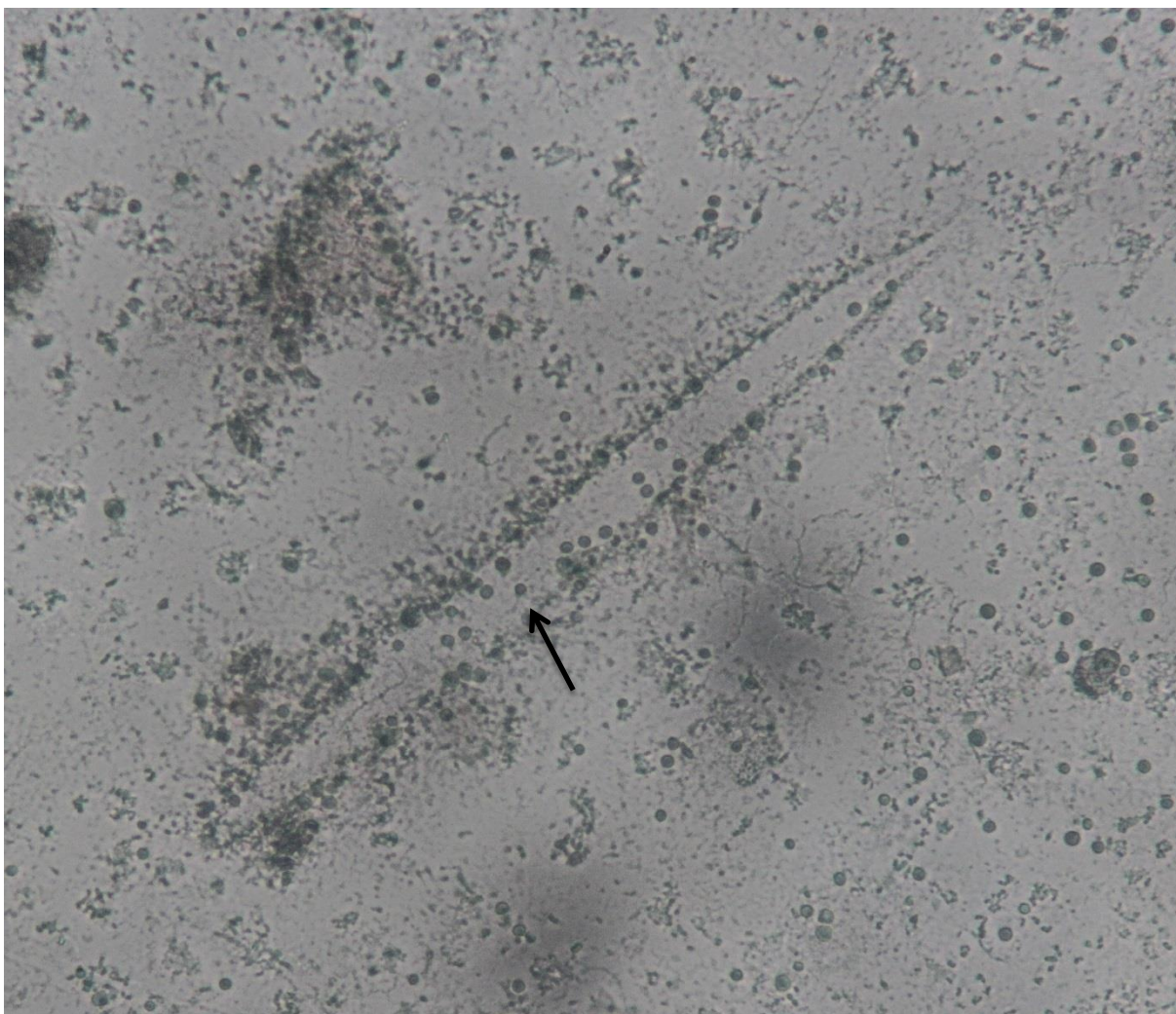
**Figura 3:** Larva de *Ancylostoma caninum* (seta preta), hifas de *Pleurotus eryngii* (seta branca) e gotícula produzida pelo fungo (seta amarela). Microscopia de luz - objetiva de 10x.



**Figura 4:** A – Larva de *Ancylostoma caninum* com hifa do fungo *Pleurotus eryngii* (seta preta). B, C e D – Larva de *Ancylostoma caninum* com gotículas produzidas pelo fungo *Pleurotus eryngii* em contato com a superfície da larva (seta preta). Microscopia de luz - objetiva de 10x.



**Figura 5:** A - Larva de *Ancylostoma caninum* com gotículas produzidas pelo fungo *Pleurotus eryngii* em contato com a superfície da larva (seta preta). B e C - Larva de *Ancylostoma caninum* com gotículas produzidas pelo fungo *Pleurotus eryngii* no interior da larva (seta preta). D - Larva de *Ancylostoma caninum* com gotículas produzidas pelo fungo *Pleurotus eryngii* no interior da larva (seta preta) e início da predação da larva pelo fungo. Microscopia de luz - objetiva de 10x.



**Figura 6:** Larva de *Ancylostoma caninum* digerida por ação do fungo *Pleurotus eryngii*. Microscopia de luz - objetiva de 10x.

A formação de armadilhas é uma resposta de fungos predadores a presença e migração de nematóides ou substâncias deles derivadas sendo um sintoma da deficiência nutricional (57, 100).

Segundo Maciel et al., a presença de L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp nas placas de petri contendo AA 2% é essencial para formação de armadilhas pelos isolados fungicos e sua nutrição em um meio pobre em nutrientes como é o AA 2%, uma vez que meios ricos em carbono e nitrogênio impedem a passagem do saprofitismo para uma habilidade predatória , havendo a formação de poucas ou nenhuma armadilha (97, 100). Em seu experimento, Maciel et al., utilizou somente meio contendo AA 2% de forma que o fungo só poderia usar as larvas de *Ancylostoma caninum* como fonte de nutrição (97).

Em ensaio realizado por Satou et al., no qual utilizou isolados fúngicos de *Pleurotus ostreatus* sobre nematóides de vida livre (Diplogastridae) também foram observados botões esféricos do *P. ostreatus* por microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica (45).

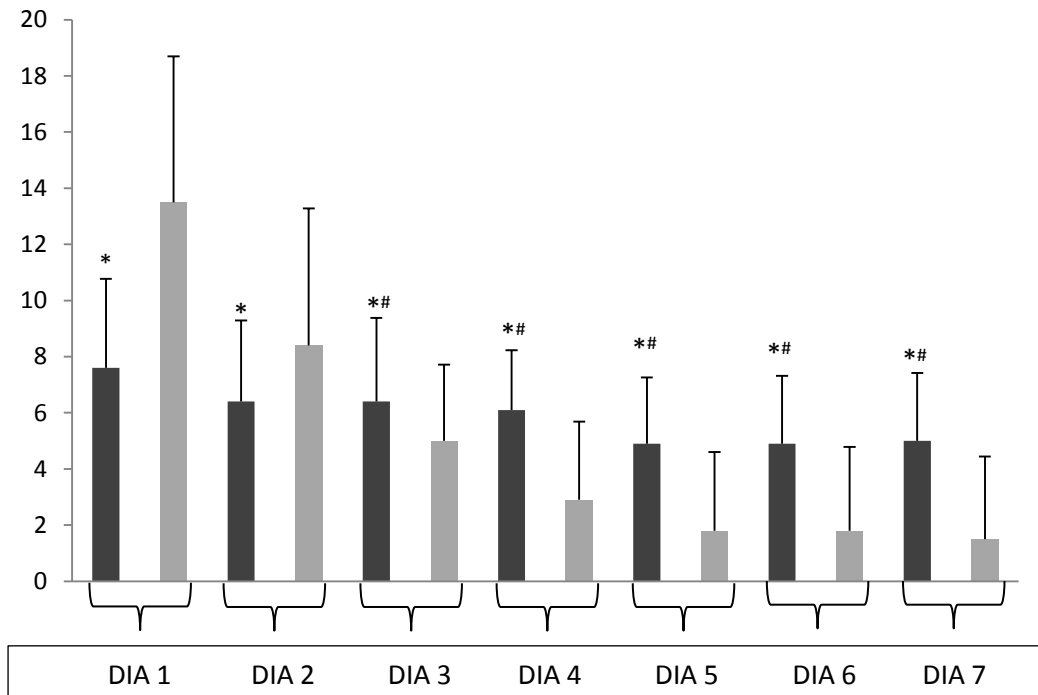
A média das larvas contadas no grupo controle e tratado durante os 7 dias consecutivos do experimento estão representadas na tabela 2. Foram encontrados valores significativos ( $p < 0,01$ ) entre as médias do grupo tratado e controle, no qual foi observada diminuição consecutiva do dia 1 ao dia 7 do número de larvas tanto do grupo tratado quanto do grupo controle (Figura 7). Encontrou-se também uma diferença significativa ( $p < 0,01$ ) nos dias 3, 4, 5, 6 e 7 do grupo tratado em relação ao dia 1 do tratamento (Tabela 2). Estes dados corroboram os dados encontrados por outros autores que também utilizaram isolados fúngicos de *Pleurotus* spp, porém larvas de outros nematóides.

**Tabela 2:** Eficiência do isolado fúngico *Pleurotus eryngii* na redução do número de larvas L<sub>3</sub> de *Ancylostoma caninum* durante 7 dias consecutivos.

| Média das larvas ( $\pm$ SD) |                      |                   |
|------------------------------|----------------------|-------------------|
|                              | Tratado              | Controle          |
| <b>Dia 1</b>                 | 7,6 ( $\pm$ 3,1) *   | 13,5 ( $\pm$ 5,1) |
| <b>Dia 2</b>                 | 6,6 ( $\pm$ 2,8) *   | 8,4 ( $\pm$ 4,8)  |
| <b>Dia 3</b>                 | 6,4 ( $\pm$ 2,9) * # | 5,0 ( $\pm$ 2,7)  |
| <b>Dia 4</b>                 | 6,1 ( $\pm$ 2,1) * # | 2,9 ( $\pm$ 2,8)  |
| <b>Dia 5</b>                 | 4,9 ( $\pm$ 2,3) * # | 1,8 ( $\pm$ 2,8)  |
| <b>Dia 6</b>                 | 4,9 ( $\pm$ 2,4) * # | 1,8 ( $\pm$ 2,9)  |
| <b>Dia 7</b>                 | 5,0 ( $\pm$ 2,4) * # | 1,5 ( $\pm$ 2,9)  |

Comparação entre colunas: \*Média dos grupos tratado e controle do respectivo dia diferem entre si ( $p < 0,01$ ).

Comparação entre linhas: # A média do grupo tratado difere ( $p < 0,01$ ) da média referente ao grupo tratado do dia 1.



**Figura 7:** Média das larvas contadas e desvio padrão (barra) do grupo tratado (cinza escuro) e do grupo controle (cinza claro).  
 Comparação entre colunas cinza claro e cinza escuro: \*Média dos grupos tratado e controle do respectivo dia diferem entre si ( $p < 0,01$ ).  
 Comparação entre colunas cinza escuro: # A média do grupo tratado difere ( $p < 0,01$ ) da média referente ao grupo tratado do dia 1.

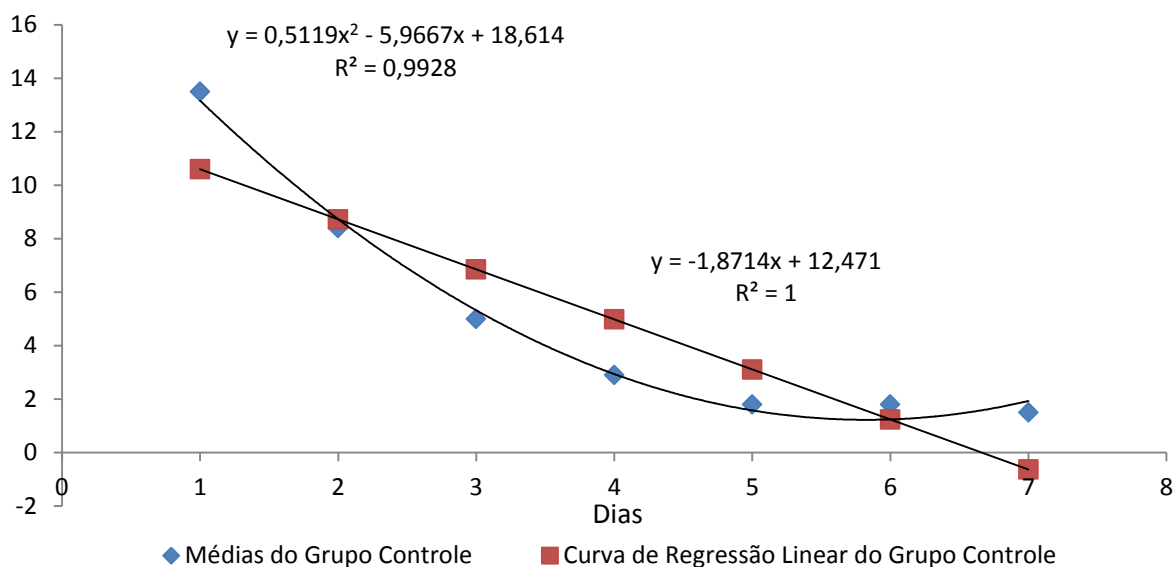
Satou et al., em exame microscópico do fungo inoculado (*P. pulmonarius*) revelou a presença de células secretoras minúsculas com pequenas gotas de fluido em toda a superfície do ágar e tornou-se evidente que as larvas dos parasitas foram imobilizadas por contato com o fungo dentro de uma a duas horas e que no prazo de quatro horas de exposição houve uma redução dramática no número de larvas móveis de todas as espécies (*Ostertagia ostertagi*, *Cooperia oncophora*, *Oesophagostomum quadrispinulatum* e *Cyathostoma*) e depois de oito horas, não foi registrada mais nenhuma motilidade das larvas (45).

Em experimento realizado por Graminha et al., avaliaram a patogenicidade dos fungos *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys conoides* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus*, *Ancylostoma* spp. e ovos larvados de *Ascaridia galli* e observaram que a predação de ambos os nematóides por *A. conoides* foi crescente, obtendo-se a máxima predação de *Ancylostoma* spp. no quarto dia, enquanto que a máxima predação de *H. contortus* só foi obtida no sexto dia e que embora a eficácia de ambos os fungos tenha sido maior sobre larvas de *H.*

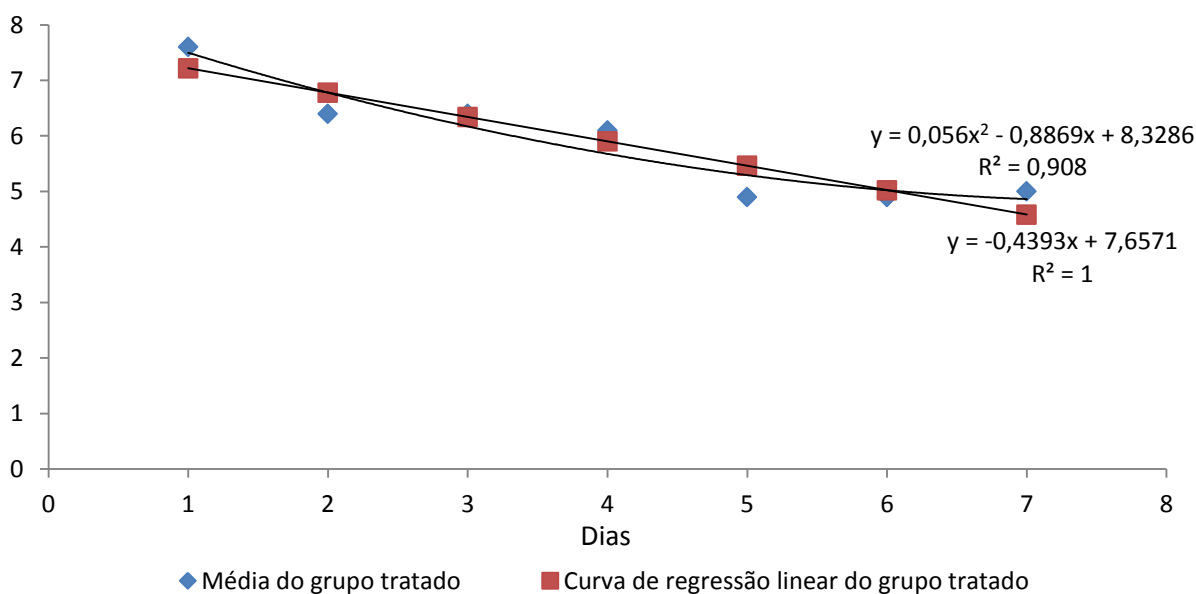
*Contortus* que de *Ancylostoma* spp., observou-se que a tendência de predação, para ambos os nematóides, foi crescente no decorrer do período experimental (101).

Os dados encontrados demonstraram que o número de larvas contadas no controle também diminuiu de forma consecutiva com o passar dos 7 dias (figura 12), justificamos essa diminuição pela migração das larvas para a periferia da placa de petri, uma vez que elas migram em busca de um local com mais umidade, e mais nutrição no meio. Em estudo realizado por Larsen e Nansen, larvas de diferentes nematóides (*Ostertagia ostertagi*, *Cooperia oneophora*, *Oesophagostomum quadrispinulatum* e espécies de *Cyathostomum* spp) tenderam a distorcer o micélio do fungo *P. pulmonarius* pelo movimento vigoroso e após três ou quatro horas as larvas estavam reunidas em torno da periferia das placas de petri onde eram difíceis de identificar e contar como móvel ou imóvel (23). Por estas razões, os dados para as larvas infectantes foi registada ao longo das primeiras três ou quatro horas de exposição. Essa migração das larvas para periferia da placa, onde há maior umidade, também foi observado por Carvalho et al., e Braga et al. (102, 103).

Com base nos valores encontrados na Tabela 2 estimaram-se as equações ajustadas da regressão para o controle e o tratado. Os coeficientes negativos de regressão linear indicam um comportamento descendente das curvas de regressão mostrando que os dias influenciaram diretamente na predação de L<sub>3</sub> de *A. caninum*, ou seja para cada dia acrescentado ao experimento a média das larvas diminuiu de 1,87 para o controle (Figura 8) e 0,43 para o tratado (Figura 9). Isto foi causado pela redução dos números médios de larvas durante o ensaio experimental, principalmente devido à captura em armadilhas fúngicas. A redução do número de larvas no grupo de controle, durante o estudo, no entanto, foi causado pela migração das larvas para a periferia das placas de Petri, local que o nível de umidade era superior.



**Figura 8:** Curva de regressão linear calculada através das médias das larvas de *Ancylostoma caninum* do grupo Controle em função do tempo (dias 1 ao 7).



**Figura 9:** Curva de regressão linear calculada através das médias das larvas de *Ancylostoma caninum* do grupo Tratado em função do tempo (dias 1 ao 7).

Em comparação com outros ensaios realizados com o mesmo nematóide (*Ancylostoma* spp), porém com outros isolados fúngicos (*Monacrosporium thaumasium*, *Arthrobotrys robusta* e *Duddingtonia flagrans*) o coeficiente linear de redução foi de 0,23; 0,24 a 0,28 nos diferentes grupos tratados respectivamente (97). Já em um estudo realizado por Braga et al., que comparou a eficiência de predação dos fungos *D. flagrans*, *M. thaumasium*, *M. sinens* e *A. robusta* sobre



larvas L<sub>3</sub> de *A. ceylanicum*, encontrou valores de coeficiente linear de redução dos grupos tratados de 0,73; 0,76; 0,78 e 0,82 respectivamente (103). Comparando os valores de coeficiente linear de redução encontrados no presente trabalho com os encontrados nos ensaios realizados por Maciel et al., nota-se que o fungo *P. eryngii* obteve valores de coeficiente linear de redução maior (0,43), o que sugere que para cada dia acrescentado ao experimento a média das larvas diminuiu mais no nematóide tratado com o fungo *P. eryngii* que com os fungos *Monacrosporium thaumasium*, *Arthrobotrys robusta* e *Duddingtonia flagrans*, o que demonstram maior influência do tempo sobre a predação das larvas de *A. caninum* do atual trabalho (97). Já quando se compara os valores de coeficiente linear de redução do presente estudo com o de Braga et al., os valores do coeficiente linear de redução foram maiores para todas as espécies de fungos estudadas (103).

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam trabalhos anteriores da eficiência de fungos nematófagos no controle de larvas de nematóides potencialmente zoonóticas. Estima-se que cerca de 1 bilhão de pessoas estão atualmente infectadas por geohelmintos, principalmente devido ao contato com o solo, indicando que esta é uma importante via de infecção humana, que está associada a consequências graves de saúde se não tratada. Além disso, os estudos sobre os parasitas que infectam animais domésticos têm provocado grande interesse devido à íntima relação que existe entre o homem e os animais, o que pode ser um problema de saúde pública. Dentre os helmintos com potencial zoonótico, destacam-se os do gênero *Ancylostoma*, *Toxocara* e *Strongyloides* (102).

*A. caninum*, *A. braziliense* e *A. ceylanicum* são ancilostomídeos onipresentes encontrados em cães, gatos e outros mamíferos de clima tropical, onde as condições são favoráveis para a sua sobrevivência. Em condições ideais de umidade os ovos evoluem para larva de terceiro estágio em aproximadamente 8 dias. Após o desencolcimento da cutícula, as larvas podem sobreviver no ambiente por muitos meses, sendo capaz de suportar calor e frio, mas não extrema seca (12).

Os fungos nematófagos que crescem em fezes frescas de animais têm maior chance de serem agentes mais eficazes no controle biológico, visto que Nansen et al., mencionaram que larvas recém eclodidas, antes de alcançarem o estágio de L<sub>3</sub>, são mais sujeitas ao ataque desses fungos. As L<sub>3</sub> têm duas cutículas que, por si só, constituiriam uma limitação para a ação dos fungos nematófagos. Portanto, é necessário conhecer o papel de todos os organismos envolvidos no

biocontrole de nematóides (105). Segundo Araújo et al., é essencial que os órgãos financiadores apoiem as pesquisas nessa área, pois muitos aspectos básicos da biologia, da epidemiologia e da interação patógeno – hospedeiro necessitam ser estudados. À indústria caberia o papel muito importante de desenvolver formulações comercialmente viáveis (59).

## CONCLUSÃO

A atividade larvicida de *Pleurotus eryngii* sobre as L<sub>3</sub> de *Ancylostoma caninum* foi comprovada por meio da redução do número de larvas após o tratamento com o fungo. Observou-se que o fungo produziu gotículas e que houve interação do fungo com a larva. Diante desses resultados faz-se necessário a realização de novas pesquisas *in vivo* que confirmem a eficácia dos isolados fúngicos *Pleurotus eryngii* sobre nematoides no ambiente.

## BIBLIOGRAFIA

1. Torres DF, Ortranto D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. *Parasites & Vectors* 2014;**7**(22).
2. Robertson ID, Irwin PJ, Lymbery AJ, Thompson RCA. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology* 2000;**30**(12-13):1369-1377.
3. Liu Y, Zheng G, Alsarakibi M, Zhang X, Hu W, Lu P, Lin L, Tan L, Luo Q, Li G. Molecular Identification of *Ancylostoma caninum* Isolated from Cats in Southern China Based on Complete ITS Sequence. *BioMed Research International* 2013;**6**.
4. Braga FR, Araujo JM, Silva AR, Araujo JV, Carvalho RO, Soares FEF, Queiroz H, Gênier HLA. Ação ovicida do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma* sp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2011;**44**(1):116-118.
5. Mota MA, Campos AK, Araújo JV. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2003;**23**(3):93-100.
6. Frassy LN, Braga FR, Silva AR, Araújo JV, Ferreira SR, Freitas LG. Destruição de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010;**43**:102-104.
7. Araújo JV, Assis RCL, Campos AK, Mota MA. Atividade *in vitro* dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* sobre nematoides trichostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) parasitos gastrintestinais de bovinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 2004a;**13**(2):65-71.

8. Castro AA, Oliveira CRC, Anjos DHS, Ornellas EI, Bittencourt VREP, Araújo JV, Sampaio IBM, Rodrigues MLA. Potencial dos fungos nematófagos *Arthrobotrys* sp. E *Monacrosporium thaumasium* para o controle de larvas de ciatostomíneos de eqüinos (Nematoda: Cyathostominae). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 2003;**12**(2):49-53.
9. Araújo JV, Mota MA, Campos AK. Controle de helmintos de animais por fungos nematófagos. Revista brasileira de Parasitologia Veterinária 2004b;**13**(0):165-169.
10. Mankau R. Biological control of nematode pests by natural enemies. *Ann. Rev. Phytopathol* 1980;**18**:415-440.
11. Dias AS, Araújo JV, Campos AK, Braga FR, Fonseca TA. Application of a formulation of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of cattle gastrointestinal nematodioses. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2007;**28**(9):10-107.
12. Thorn RG, Barron GL. Carnivorous mushrooms. *Science* 1984;**224**(1):67-78.
13. Palizi P, Goltapeh EM, Pourjam E, Safaie N. Potencial of oyster mushrooms fot the biocontrol of sugar beet nematode (*Heterodera schachtii*). Journal of Plant Protection Research 2009;**49**(1):27-34.
14. Pandey VS. Predatory activity of nematode trapping fungi against the larvae of *Trichostrongylus axei* and *Ostertagia ostertagi*: a possible method of biological control. *Journal Helminthology* 1973;**48**(1):35-48.
15. Drechsler C. Some hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. *Mycologia* 1937;**29**:447-552.
16. Gray NF. Fungi attackhing vermiform nematodes. In: Poinar OG, Borne JH. (Eds). Diseases of nematodes. Boca Raton: CRC Press; 1988.

17. Santos CP. Fungos nematófagos. Simpósio sobre Controle de Parasitas em Pequenos Ruminantes; 2005.
18. Araújo JV, Santos MA, Ferraz S, Magalhães ACM. Controle de larvas infectantes de *Haemonchus placei* por fungos predadores da espécie *Monacrosporium ellypsosporum* em condições de laboratório. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária 1992;**44**(6):521-526.
19. Araújo JV, Santos MA, Ferraz S, Maia AS. Antagonistic effect of predacious *Arthrobotrys* fungi on infective *Haemonchus placei* larvae. The Journal of the Helminthology 1993;**67**(2):136-138.
20. Araújo JV, Santos MA, Ferraz S. Biological control *in vitro* of infective *Haemonchus placei* larvae by predacious fungi *Arthrobotrys musiformis*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 1994;**46**(3):194-204.
21. Araújo JV, Santos MA, Ferraz S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 1995;**47**(1):32-42.
22. Charles TP, Santos CP, Alvim GP. Atividade Predatória de duas Espécies de Fungos Nematóforos nos Estágios de Vida Livre de Nematódeos Trichostrongilídeos. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária; São Paulo, Suplemento 1993;**1**:46.
23. Larsen M, Nansen P. Ability of the fungus *Pleurotus pulmonarius* to immobilize preparasitic nematode larvae. Research in Veterinary Science 1991;**51**:246-249.
24. Graminha EBN. Isolamento e atividade predatória de fungos nematóforos sobre nematoides gastrintestinais de ovinos da micro região de Jaboticabal-SP. Jaboticabal: UNESP. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista; 2004.
25. Barron GL. The nematode-destroying fungi. Topics in Mycobiology Canadian Biological Publications; Guelph 1977;**1**:140.

26. Perry RM, Wright DJ. The physiology and biochemistry of free-living and plant parasitic nematodes. CABI Publishing, Wallingford; 1998.
27. Fetterer RH, Rhoads ML. Biochemistry of the nematode cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. *Veterinary Parasitology* 1993;**46**(1-4):103-111.
28. Araújo JV. Inibição de captura de larvas infectantes de *Cooperia punctata* por fungos do gênero *Arthrobotrys*, utilizando carboidratos e lectinas. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 2001;**10**(1):7-11.
29. Field JI, Webster J. Traps of predacious fungi attract nematodes. *Trans Br Mycol Societ* 1977;**68**:467-469.
30. Nordbring-Hertz B. Nematophagous fungi: Strategies for nematode exploitation and for survival. *Microbiological Sciences* 1988;**5**:108-116.
31. Tunlid A, Rosén S, Nordbring-Hertz B. Molecular mechanisms of adhesion in the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Journal Mycology Médecine* 1992;**2**:36-42.
32. Araújo JV, Gomes APS, Guimarães MP. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southern Brazil by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 1998;**7**(2):117-122.
33. Huang XW, Zhao NH, Zhang KQ. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. *Res Microbiol* 2004;**155**:811–816.
34. Wharton DA. Nematode egg-shells. *Parasitology* 1980;**81**:447–463.

35. Lopez-Llorca LV. Purification and properties of extracellular proteases produced by the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium*. *Can J Microbiol* 1990;**36**:530–537.
36. Niu QH, Huang XW, Tian BY, Yang JK, Liu J, Zhang L, Zhang KQ. *Bacillus* sp. B16 kills nematodes with a serine protease identified as a pathogenic factor. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006a;**69**:722–730
37. Niu Qh, Huang Xw, Zhang L, Li Y, Li J, Yang Jk, Zhang Kq. A neutral protease from *Bacillus nematocida*, another potential virulence factor in the infection against nematodes. *Arch Microbiol* 2006b;**185**:439–448.
38. Yang J, Liang L, Li J, Zhang K. Nematicidal enzymes from microorganisms and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;**97**:7081–7095.
39. Yang JK, Tian BY, Liang LM, Zhang KQ. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;**75**:21–31.
40. Segers R, Butt TM, Kerry BR, Peberdy JF. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* produces a chymoelastaselike protease which hydrolyses host nematode proteins in situ. *Microbiology* 1994;**140**:2715–2723.
41. Maclennan JD, Mandl I, Howes EL. Bacterial digestion of collagen. *J Clin Invest* 1953;**32**:1317-1322.
42. Kwok OCH, Plattner R, Weisleder D, Wicklow DT. *J. Chem. Ecol.* 1992;**18**:127—136.
43. Putzke MTL, Matsumura ATS, Cavalcanti MAQ, Filho AC. Taxonomia e importância das espécies de *Hohenbuehelia*, *Resupinatus* e *Pleurotus* no controle de *Meloidogyne javanica*. *Caderno de Pesquisa série Biologia* 2007;**19**(3):38-81.
44. Truong BN, Okazaki K, Fukiharu T, Takeuchi Y, Futai K, Le XT, Suzuki A. Characterization of the nematocidal toxocyst in *Pleurotus* subgen. *Coremiopleurotus*. *Mycoscience* 2007;**48**(1):222–230.



45. 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):574-576.
46. Wang JP, Wang JX, Liu F, Pan CS. Enhancing the virulence of *Paecilomyces lilacinus* against *Meloidogyne incognita* eggs by overexpression of a serine protease. *Biotechnol Lett* 2010;**32**:1159-1166.
47. Lopez-Llorca LV, Olivares-Bernabeu C, Salinas J, Jansson JHB, Kolattukudy PE. Pre-penetration events in fungal parasitism of nematode eggs. *Mycology Research* 2002;**106**(4):499-506.
48. Lysek H, Nigenda G. Capacidad de auto deshelmintización del suelo. *Salud Pública de México* 1989;**31**(6):763-771.
49. Lysek H, Sterba J. Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamyosporium* Goddard. *Folia Parasitologica* 1991;**38**:255-259.
50. Lysek H, Fassatová O, Pineda NC, Hernández NL. Ovicidal fungi in soils from Cuba. *Folia Parasitologica* 1982;**29**:265-270.
51. Ribeiro RR. Atividade predatória sobre larvas de tricostrongilídeos de isolados fúngicos do gênero *Monacrosporium* após a passagem pelo trato gastrointestinal de bovinos. Viçosa: UFV. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa; 2003.
52. Jatala P. Biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 1986;**24**(0):453-89.
53. Dackman C, Nordbring-Herstz B. Conidial traps-a new survival structure of nematode trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Mycology Research* 1992;**96**(1):194-198.
54. Rubner A. Revision of predacious Hyphomycetes in the *Dactylella-Monacrosporium* complex. *Studies in Mycology* 1996;**39**:1-134.

- 55.** Jansson HB, Nordbring-Hertz B. Interactions between nematophagous fungi and plant-parasitic nematodes: Attraction, induction of trap formation and capture. *Nematologica* 1980;**26**:383-389.
- 56.** Lysek G, Nordbring-Hertz B. An endogenous rhythm of trap formation in the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Planta* 1981;**152**:50-53.
- 57.** 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. *Veterinary Parasitology* 1996;**64**(1-2):47-64.
- 58.** Larsen M. Biological control of helminths. *International Journal for Parasitology* 1999;**29**:139-146.
- 59.** Araújo JV, Stephano MA, Sampaio WM. Passage of nematode-trapping fungi through the gastrointestinal tract of calves. *Veterinarski Arhiv* 1999;**69**(2):69-78.
- 60.** Freitas LG, Oliveira RDL, Ferraz S. Introdução a nematologia. Universidade Federal de Viçosa 2006;**58**:57-59.
- 61.** Jafee BA, Storg DR, Muldoon AE. Nematode-trapping fungi of the a natural scrubland: tests for food chain involvement. *Mycologia* 1996;**88**(4):444-564.
- 62.** Kerry BR, Simon A, Rovira AD. Observations on the introduction of *Verticillium chlamydosporium* and other parasitic fungi into soil for control of the cereal cystnematode *Heterodera avenae*. *Annals of Applied Biology* 1984;**105**:509-516.
- 63.** Pearsson Y, Erland S, Jansson HB. Identification of *Arthrobotrys* species using RFLP analysis of PCR amplified rDNA. *Nematologica* 1995;**41**:329-332.
- 64.** Faedo M, Larsen M, Dimander SO, Yeates GW, Höglund J, Waller PJ. Growth of the Fungus *Duddingtonia flagrans* in soil surrounding feces deposited by cattle or sheep fed the fungus to control nematode parasites. *Biological Control* 2002;**23**(1):64-70.

65. Juniper AJ. Dung as a source of predacious fungi. *Transaction British Mycological Society* 1957;**40**(2):346-348.
66. Larsen M, Wolstrup J, Henriksen SA, Gronvold J, Nansen P. *In vivo* passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. *Journal of Helminthology* 1992;**66**:137-141.
67. Waller PJ, Larsen M, Faedo M, Henessy DR. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematodes parasites of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology* 1994;**51**(3-4):289-299.
68. Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Carvalho RO, Silva AR, Tavela AO, Maciel AS. Observação *in vitro* da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2007;**40**(3):356-358.
69. Kerry BR. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 2000;**38**(1):323-441.
70. Waller PJ. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. *Animal Feed Science Technology* 2005;**126**(3-4):277-289.
71. Barger IA. The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. *International Journal for Parasitology* 1999;**29**:41-47.
72. Barron GL, Thorn RG. Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. *Canadian Journal of Botany* 1987;**65**:774-778.

73. Saikawa M, Wada N. Adhesive knobs in *Pleurotus ostreatus* (the oyster mushroom), as trapping organs for nematodes. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 1986;**27**:113-118.
74. Sánchez A, Esqueda M, Gaitán-Hernández R, Córdova A, Coronado ML. Uso potencial del rastrojo de tomate como sustrato para el cultivo de *Pleurotus* spp. *Rev Mex Micol* 2008;**28**:17–24.
75. Espinosa VRM, Turpin MS, Delfín AI, Vázquez MA. Disposable diapers biodegradation by the fungus *Pleurotus ostreatus*. *Waste Management* 2011;**31**:1683–1688.
76. Porter NA, Weber BA, Weenen H, Khan JA. *J. Am. Chem. Soc.* 1980;**102**:5597—5601.
77. Yilmaz N, Solmaz M, Türkekul I, Elmastas M. *Food Chem.* 2006;**99**:168-174.
78. Ohga S, Royse DJ. Cultivation of *Pleurotus eryngii* on umbrella plant (*Cyperus alternifolius*) substrate. *J. Wood Sci.* 2004;**50**:466-469.
79. Dias DC, Oliveira ACC, Dias PF, Valle JS, Colauto GAL, Colauto NB, Barcellos FG. Caracterização da diversidade genética de linhagens de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida* e *Pleurotus eryngii*. *Resumo*; 2012.
80. Usami A, Motooka R, Nakahashi H, Yoshiharu O, Miyazawa M. Characteristic Odorants from Bailingu Oyster Mushroom (*Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis*) and Summer Oyster Mushroom (*Pleurotus cystidiosus*). *Journal of Oleo Science.* 2014;**63**(7):731-739.
81. Liu Y, Zheng G, Alsarakibi M, Zhang X, Hu W, Lu P, Lin L, Tan L, Luo Q, Lu P, Li G. The Zoonotic Risk of *Ancylostoma ceylanicum* Isolated from Stray Dogs and Cats in Guangzhou, South China. *BioMed Research International*; 2014.

- 82.** Chan MS, Medley GF, Jamison D, Bundy DA. The evaluation of potential global morbidity attributable to intestinal nematode infections. *Parasitology* 1994;**109**:373–387.
- 83.** Conlan JV, Khamlome B, Vongxay K, Elliot A, Pallant L, Sripa B, Blacksell SD, Fenwick A, Thompson RCA. Soil-transmitted helminthiasis in Laos: a community-wide cross-sectional study of humans and dogs in a mass drug administration environment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2012;**86**:624–634.
- 84.** Ngui R, Lim YAL, Traub R, Mahmud R, Mistam MS. “Epidemiological and genetic data supporting the transmission of *Ancylostoma ceylanicum* among human and domestic animals,” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2012;**6**(2).
- 85.** Global Health - Division of Parasitic Diseases and Malaria. Centers for Disease Control and Prevention; 2013. Site (<http://www.cdc.gov/dpdx/hookworm/>) acessado em 25/11/2014.
- 86.** Crompton DWT. How much human helminthiasis is there in the world? *J Parasitol* 1999;**85**:397-403.
- 87.** Santarém VA, Giuffrida R, Asin GA. Larva migrans cutânea: ocorrência de casos humanos e identificação de larva de *Ancylostoma* spp em parque público do município de Taciba, São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004;**37**:179-181.
- 88.** Dos Santos HA, Barçante JMP, Ribeiro VM, Dias SRC, Oliveira Júnior SD, Barçante TA, Lima WS. Frequência de parasitos intestinais em cães filhotes do município de Belo Horizonte – Minas Gerais. Anais do XII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 01 a 05 de setembro de 2002, Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Rio de Janeiro; 2002.
- 89.** Katagiri S, Oliveira-Sequeira TC. Prevalence of dog intestinal parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in São Paulo State, Brazil. *Zoonoses Public Health* 2008;**55**:406–413.

90. Brenner MA, Patel MB. Cutaneous larva migrans: the creeping eruption. *Cutis* 2003;**72**:111-115.
91. Prociv P, Croese. Human enteric infectious with *Ancylostoma caninum* :hookworms reappraised in the light of a “new”zoonosis. *Acta Trop.* 1996;**62**:23-44.
92. Ribeiro VM. Controle de Helmintos de Cães e Gatos. XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, Ouro Preto, MG. *Rev. Bras. Parasitol.Vet.* 2004;**13**(1).
93. Robertson ID, Thompson RC. Enteric parasitic zoonoses of domesticated dogs and cats. *Microb Infect* 2002;**4**:867-873.
94. Kalkofen UP. Hookworms of dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1987;**17**(6):1341-1354.
95. Braga FR. Ação *In Vitro* De Fungos Das Espécies *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* e *Pochonia chlamydosporia* Sobre Ovos de *Fasciola hepatica* e *Schistosoma mansoni*.Dissertação (Mestrado); 2008.
96. Ayres M, Ayres JRM, AyresDL, Santos AS. Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas. Belém: Sociedade civil mamirauá:Brasília CNPq; 2003.
97. Maciel AS, Araujo JV, Cecon PR. Atividade predatória *in vitro* dos fungos *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de *Ancylostoma* spp em cães. *Rev Bras Parasitol Vet* 2006;**15**(2):71-75.
98. Fernandes FM, Araújo JV, Braga FR, Gazzinelli-Guimarães PH, Juliana Milani Araujo, Ferreira SR, Carvalho RO, Mello INK, Fujiwara RT. *In vitro* biological control of infective larvae of *Ancylostoma ceylanicum*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal 2012;**21**(3):283-286.
99. Marino RH, Silva DGC. *Scientia Plena* 2013;**9**.

- 100.** Scholler M, Rubner A. Predacious activity of the nematode destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* independence of the medium composition. *Microbiological Research* 1994;**149**(1):145-149.
- 101.** Graminha EBN, Maia AS, Santos JM, Cândido RC, Silva GS, Costa AJ. Avaliação *in vitro* da patogenicidade de fungos predadores de nematoides parasitos de animais domésticos. *Semina: Ci. Agrárias, Londrina*, 2001;**22**(1):11-16.
- 102.** Carvalho RO, Araújo JV, Braga FR, Araujo JM, Silva AR, Tavela AO. Predatory activity of nematophagous fungi on *Ancylostoma* ssp. infective larvae: evaluation *in vitro* and after passing through gastrointestinal tract of dogs. *J Helminthol* 2009;**83**:231-236.
- 103.** Braga FR, Silva AR, Carvalho RO, Araújo JV, Guimarães PHG, Fujiwara RT, Frassy LN. *In vitro* predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Ancylostoma ceylanicum* third-stage larvae. *Veterinary Microbiology* 2010;**146**:183-186.
- 104.** Patteson MW, Gibbs C, Wotton PR, Day MJ. *Angiostrongylus vasorum* infection in seven dogs. *Vet Rec* 1993;**4**:565-570
- 105.** Nansen P, Gronvold J, Henriksen SA, Wolstrup J. Predacious activity of the nematode destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* on preparasitic larvae of *Cooperia oncophora* and on soil nematodes. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 1986;**53**:237-243.